

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

LETÍCIA URNAU

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE
CAROTENOIDES POR *Phaffia rhodozyma* Y-17268 EM BIORREATOR
BATELADA SIMPLES E ALIMENTADA**

ERECHIM- RS

2018

LETÍCIA URNAU

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE
CAROTENOIDES POR *Phaffia rhodozyma* Y-17268 EM BIORREATOR
BATELADA SIMPLES E ALIMENTADA**

**Tese apresenta como quesito
parcial à obtenção do grau de
Doutor, pelo curso de Pós-
Graduação em Engenharia de
Alimentos da Universidade
Regional Integrada do Alto Uruguai
e das Missões – Campus Erechim.**

Orientadoras:

**Prof. Dra. Eunice Valduga
Prof. Dra. Clarice Steffens**

ERECHIM- RS

2018

LETÍCIA URNAU

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE
CAROTENOIDES POR *Phaffia rhodozyma* Y-17268 EM BIORREATOR
BATELADA SIMPLES E ALIMENTADA**

**Tese apresentada como quesito parcial
à obtenção do grau de Doutor, pelo
curso de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos da
Universidade Regional Integrada do
Alto Uruguai e das Missões – Campus
Erechim.**

Erechim, 04 de abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Eunice Valduga/ URI Erechim (Orientadora)

Prof^a. Dra. Clarice Steffens/ URI Erechim (Orientadora)

Prof^a. Dra. Jamile Zeni/ URI Erechim

Prof^a. Dra. Rosicler Colet / URI Erechim

Prof^a. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert / FURG

Prof^a. Dra. Rosângela Assis Jacques / UFRGS

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por me iluminar durante toda essa caminhada.

À minha família, meus pais Luís e Veranice, e minha irmã Luísa, por todo apoio, amor e compreensão demonstrados durante o período do doutorado. Sem vocês, nada seria possível.

Às minhas orientadoras Eunice Valduga e Clarice Steffens, pelos ensinamentos, conselhos, apoio e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Rosicler, que hoje é membro da banca, mas que durante todo o trabalho esteve ao meu lado, ensinando e ajudando no que foi necessário.

À todos os bolsistas de iniciação científica que passaram pelo projeto, em especial à Paloma, Fernanda e Luana, que além de ajudarem na realização da parte experimental, tornaram-se pessoas especiais pra mim.

À minha amiga Naira, e agora sua pequena Valentina, pela amizade conquistada nesses anos e que serão levadas para toda a vida. A presença de amigos verdadeiros torna nossos dias mais agradáveis e nossa caminhada menos árdua.

À Anne e Maiara, amigas que chegaram mais tarde, mas que deixaram a rotina no laboratório e sala de estudos mais agradável.

À todos os colegas dos laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Termodinâmica, em especial à Sandy, pela companhia, conversas, momentos de discussões e de descontração.

À UFRGS, em especial ao Instituto de Química, representado pela professora Rosângela, e ao ICTA, representado pelo professor Eliseu. Também à todos os bolsistas e técnicos envolvidos. Ao Raul, pela ajuda e conhecimento repassados. À Taís e Enelise por me ajudarem na realização das análises, e um agradecimento especial à Bruna Bernar Dias e ao Maurício Perin, por além de me auxiliarem na “parte técnica” e me ensinarem muito, se tornaram amigos por quem tenho um grande apreço.

À todos professores e funcionários do PPG em Eng. de Alimentos da URI.

À FAPERGS, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro na realização da pesquisa.

À todos que cruzaram meu caminho nesta etapa, o meu muito obrigada!

*“Viva como se fosse morrer amanhã,
aprenda como se fosse viver para
sempre”.*

(Gandhi)

RESUMO

A produção biotecnológica de carotenoides resulta em produtos seguros para aplicação em alimentos, sendo considerados produtos naturais, além disso é possível controlar a produção independente da matéria prima, estação do ano, de condições ambientais e permite a utilização de substratos de baixo custo, tais como resíduos agroindustriais. Assim, este trabalho teve por objetivo a obtenção de carotenoides por *Phaffia rhodozyma* Y-17268 utilizando substratos agroindustriais (água de maceração de milho- AMM, água de parboilização de arroz- APA, hidrolisado de levedura- Prodex® e glicerol bruto) em frascos agitados, biorreator batelada simples e alimentada. Inicialmente avaliou-se os efeitos da composição do meio de cultivo em frascos agitados, e das condições operacionais (agitação e aeração) em biorreator batelada simples empregando metodologia de planejamento de experimentos, e posteriormente em sistema batelada alimentada avaliando-se o volume de alimentação em tempos intermitentes (50, 75, 112,5 e 150 mL a cada 12 h). Nos sistemas foram avaliados parâmetros cinéticos (consumo de substratos, produção celular e de carotenoides) e estequiométricos (produtividade de carotenoides e célula, velocidade específica de crescimento e os fatores de conversão de substrato em carotenoides e células). Um planejamento fatorial completo 2² permitiu a otimização da produção de carotenoides em frascos agitados onde a máxima concentração de carotenoides específicos foi de 335,7 µg/g em meio composto por 100 g/L de AMM, 100 g/L de glicerol e 20 g/L de APA, 25°C, 180 rpm, 96 h e pH inicial de 4,0. No sistema biorreator batelada simples e batelada alimentada a máxima produção de carotenoides específicos foram de 638,79 µg/g e 835,34 µg/g, utilizando 1,5 vvm de aeração e 250 rpm de agitação em meio composto por 100 g/L de AMM, 100 g/L de glicerol e 20 g/L de APA, 25°C, 96 h, pH inicial de 4,0 e na batelada alimentada foi adicionado 75 mL de meio a cada 12 h, respectivamente. O sistema em biorreator em batelada alimentada foi eficiente quando comparado aos demais sistemas estudados, apresentando uma produção 87% e 175% maior em relação a batelada simples e aos frascos agitados, respectivamente, se tratando de carotenoides totais, quanto aos específicos, o incremento foi de 32% e 149% em relação à batelada simples e frascos agitados, respectivamente. Os carotenoides identificados foram β-caroteno e γ-caroteno, sendo o β-caroteno o composto majoritário, representando juntamente com seus isômeros *cis* e *trans* em média 95%. Dessa forma, a utilização do sistema batelada alimentada foi uma estratégia eficiente de aumento de escala pois ocasionou um incremento na bioprodução de carotenoides. Além disso, o uso de resíduos agroindustriais torna o processo economicamente viável e industrialmente praticável.

Palavras-chave: Carotenoides. Biorreator. Resíduos agroindustriais. Batelada alimentada.

ABSTRACT

The biotechnological production of carotenoids results in safe products for food application, being considered as natural products, in addition it is possible to control the independent production of the raw material, season of environmental conditions and allows the use of substrates of low cost, such as agro-industrial waste. Thus, this study aimed to obtain carotenoids from *Phaffia rhodozyma* Y-17268 using agro-industrial substrates (corn steep liquor - CSL, rice parboiling water – RPW, hydrolyzate yeast - Prodex® and crude glycerol) in shaken flasks, batch and fed-batch in bioreactor. Initially the effects of the composition of the culture medium on shaken flasks, and the operational conditions (agitation and aeration) in simple bioreactor using experiment planning methodology were evaluated and afterwards the feeding volume in intermittent times (75, 112,5 150 and 50 mL every 12 hours). Kinetic parameters (substrate consumption, cell and carotenoid production) and stoichiometric parameters (carotenoid and cell productivity, specific growth rate, and carotenoid and cell conversion factors) were evaluated in the systems. A complete 2² factorial design allowed the carotenoids production optimization in shaken flasks being the maximum specific carotenoids concentration (335,7 µg/g) obtained in medium composed by 100 g/L of CSL, 100 g/L of glycerol and 20 g/L of RPW and 25°C, 180 rpm, 96 h, initial pH 4,0). In simple and fed batch bioreactor system the maximum production of specific carotenoids were 638,79 µg/g and 835,34 µg/g, using 1,5 vvm of aeration and 250 rpm of agitation in medium composed 100 g/L of CSL, 100 g/L of glycerol and 20 g/L of RPW and 25°C, 180 rpm, 96 h, initial pH 4,0, and in the fed batch was added 75 ml of medium every 12 h, respectively. The system bioreactor in fed-batch was efficient when compared to other systems studied, with a production 87% and 175% higher than in simple batch and shake flasks, respectively, in the case of total carotenoids, as to the specific, the increase was of 32% and 149% in relation to the simple batch and shaken flasks, respectively. The carotenoids identified were β-carotene and γ-carotene, with β-carotene being the major compound, together with its *cis* and *trans* isomers on average 95%. Thus, the use of the fed batch system was an efficient scale-up strategy because it caused an increase in the bioproduction of carotenoids. In addition, the use of agro industrial wastes makes the process economically viable and industrially feasible.

Keywords: Carotenoids. Bioreactor. Agro-industrial wastes. Fed-batch.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química dos pigmentos carotenoides.	17
Figura 2- Imagem do biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides.....	33
Figura 3- Curva de crescimento celular da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i> durante 50 h de cultivo em frascos agitados com meio YM em função da densidade ótica (DO). .	35
Figura 4- Gráfico de Pareto para a bioprodução de carotenoides específicos em frascos agitados com resíduos agroindustriais em função das variáveis independentes.....	47
Figura 5- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para recuperação de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) em função da concentração de água de maceração de milho (g/L) concentração de glicerol (g/L), respectivamente.	50
Figura 6- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para os carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$) em função da aeração (vvm) e agitação (rpm) em biorreator batelada simples, respectivamente.	55
Figura 7- Gráfico de Pareto para a bioprodução de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) em biorreator em batelada simples em função das variáveis independentes.	57
Figura 8- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de matérias primas: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em biorreator batelada simples.	59
Figura 9 - Produtividade em carotenoides global (P_{car}) (a) e fator de conversão de células em carotenoides ($Y_{p/x}$) (b) em biorreator batelada simples (96 h, 1,5 vvm, 250 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0).....	61
Figura 10 - Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em biorreator batelada simples.	62
Figura 11- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides totais ao longo da bioprodução em biorreator batelada simples.	63
Figura 12- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em biorreator batelada simples.....	64
Figura 13- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substratos: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (1) com uma taxa de alimentação de 50 mL a cada 12 h.....	66

Figura 14- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substratos: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (2) com uma taxa de alimentação de 75 mL a cada 12 h.....	67
Figura 15- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substrato: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (3) com uma taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h.....	68
Figura 16- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substrato: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (4) com uma taxa de alimentação de 150 mL a cada 12 h.....	69
Figura 17- Produtividade em carotenoides global (P_{car}) ao longo da produção em biorreator batelada alimentada nos Ensaios1 (50 mL), 2 (75 mL), 3 (112,5 mL), e 4 (150 mL).....	72
Figura 18- Relação entre a produção de carotenoides e a produção de células ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos Ensaios 1 (50 mL), 2 (75 mL), 3 (112,5 mL) e no 4 (150 mL).....	73
Figura 19- 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 – 50 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL), no Ensaio 3 (c – 112,5 mL) e no Ensaio 4 (d- 150 mL), respectivamente.	74
Figura 20- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 50 mL), no Ensaio 2 (b – 75 mL), no Ensaio 3 (c – 112,5 mL) e no Ensaio 4 (d- 150 mL), respectivamente.	76
Figura 21- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 50 mL), no Ensaio 2 (b – 75 mL), Ensaio 3 (c – 112,5 mL) e no Ensaio 4 (d- 150 mL), respectivamente.....	78
Figura 22- Cromatograma obtido por HPLC-DAD dos carotenoides por processo de batelada alimentada.	82
Figura 23- Cinética de produção de carotenoides totais e biomassa de <i>P. rhodozyma</i> para ensaio em batelada alimentada com uma taxa de alimentação de 75 mL a cada 12 h em função do carotenoide majoritário.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis e níveis estudados no planejamento do tipo Plackett Burman (<i>Screening design</i>) para a bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.	32
Tabela 2- Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2 ² para a bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.	32
Tabela 3- Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2 ² para bioprodução de carotenoides em biorreator batelada simples por <i>P. rhodozyma</i>	33
Tabela 4- Volume de alimentação de meio no biorreator a cada 12 h de bioprodução.	34
Tabela 5- Densidade óptica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) da água de maceração de milho com tratamento (AMMt) e sem tratamento (AMMs) ácido, água de parboilização de arroz (APA) e do glicerol bruto.....	44
Tabela 6- Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett Burman (<i>Screening Design</i>) com valores codificados (reais) e resposta em termos de carotenoides específicos (µg/g) e totais (µg/L) produzidos por <i>P. rhodozyma</i> Y-17268 em frascos agitados...	46
Tabela 7- Matriz do planejamento fatorial completo 2 ² (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos (µg/g) e totais (µg/L) em frascos agitados. ...	48
Tabela 8- Valores de carotenoides totais experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR.....	51
Tabela 9- Matriz do planejamento fatorial completo 2 ² (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos e totais por <i>P. rhodozyma</i> Y-17268, após bioprodução em biorreator batelada simples.....	53
Tabela 10- Valores de carotenoides totais experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR.....	56
Tabela 11- Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em biorreator batelada simples em função dos tempos de bioconversão, com produção pela levedura <i>P. rhodozyma</i> Y-17268.	65
Tabela 12- Consumo de substrato (%) ao longo da bioprodução em biorreator batelada alimentada ao final de cada ensaio.	71

Tabela 13- Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de carotenoides em batelada alimentada.....	80
Tabela 14- Máxima recuperação de carotenoides específicos e totais obtidas em diferentes sistemas.	81
Tabela 15- Composição dos carotenoides obtidos por <i>P. rhodozyma</i> Y-17268 em batelada alimentada dos picos do cromatograma.	83
Tabela 16- Cinética da bioprodução de carotenoides específicos e totais para ensaio em batelada alimentada com volume de alimentação de 75 mL a cada 12 h, expresso em termos do β -caroteno.	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Carotenoides	16
2.1.1 Propriedades e funções dos carotenoides	18
2.2 Produção biotecnológica de carotenoides	18
2.2.1 Principais fatores que influenciam a produção de carotenoides	19
2.2.2 Sistemas de bioprodução de carotenoides	23
2.3 Recuperação de biocompostos	25
2.4 Caracterização de carotenoides	27
2.5 Considerações Finais	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Micro-organismo e meio de cultura.....	29
3.1.1 Micro-organismo	29
3.1.2 Manutenção e reativação da cultura microbiana	29
3.1.3 Preparo do inóculo.....	30
3.1.4 Meio de bioprodução	30
3.2. Bioprodução de carotenoides.....	31
3.2.1 Maximização da bioprodução em frascos agitados	31
3.2.2 Bioprodução em biorreator	32
3.2.3 Bioprodução em biorreator batelada alimentada	34
3.3 Recuperação de carotenoides	35
3.4 Determinações analíticas	36
3.4.1 Determinação dos carotenoides específicos	36
3.4.2 Determinação de carotenoides totais.....	36
3.4.3 pH	37
3.4.4 Teor de glicerol do meio	37
3.4.5 Carbono orgânico total (COT) e Nitrogênio total (NT).....	38
3.5 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução	38
3.5.1 Velocidades instantâneas e específicas globais	38

3.5.2 Fatores de conversão global.....	39
3.5.3 Produtividade global	41
3.6 Análise dos carotenoides por HPLC	41
3.6.1 Preparo das amostras.....	41
3.6.2 Preparo da curva analítica	42
3.6.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectro de massas (HPLC-DAD e HPLC-DAD/MS-APCI).....	42
3.7 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Caracterização de substratos agroindustriais	44
4.2 Batelada simples em frascos agitados	45
4.3 Biorreator batelada simples	53
4.3.1 Estudo cinético da bioprodução de carotenoides em biorreator batelada simples.....	58
4.4 Bioprodução de carotenoides em biorreator batelada alimentada.....	65
4.4.1 Parâmetros Estequiométricos.....	72
4.5 Comparação entre os sistemas	81
4.6 Identificação e quantificação dos carotenoides.....	81
5. CONCLUSÕES	87
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICES	101

1 INTRODUÇÃO

A vasta aplicabilidade dos carotenoides, resultam no aumento de sua demanda pelas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos, cujo mercado mundial foi avaliado em 1,2 bilhões em 2010, com uma expectativa de crescimento para 1,4 bilhões em 2018 com uma taxa composta de crescimento anual de 2.3%. O β -caroteno é o carotenoide de maior consumo, com um valor de mercado de 261 milhões de dólares em 2010, apresentando um crescimento anual de 3,1%. Em seguida no mercado de consumo encontram-se a luteína e astaxantina (BCC, 2015). O que levou a um maior interesse dos pesquisadores em descobrir novas fontes, processos e técnicas que pudessem ser empregadas para intensificar o aumento da produção destes pigmentos por micro-organismos. Além disso, os carotenoides bioproduzidos a partir de microalgas, bactérias, leveduras e fungos são considerados naturais e os obtidos por síntese química ou da extração de algumas plantas, envolvem um grande número de reações complexas (FÁBREGAS et al., 2001; BHOSALE, 2004; HUI et al., 2007; MATA-GÓMEZ et al., 2014; CARDOSO et al., 2016).

Os carotenoides estão amplamente distribuídos na natureza, mas mesmo assim, em todo o mundo, o volume de produção é dominado pelos métodos sintéticos. No entanto, o impacto negativo causado por compostos sintéticos em produtos alimentícios, está forçando as indústrias a buscarem uma alternativa, e a produção biotecnológica vem sendo uma opção para esses mercados (MATTEA, MARTÍN e COCERO, 2008). Na última década, a aplicação de produtos naturais em alimentos tem ganhado interesse devido aos efeitos benéficos à saúde que esses compostos apresentam (URSACHE et al., 2018). Uma das características mais importantes dos carotenoides é sua habilidade de agir como antioxidante protegendo células e tecidos dos radicais livres (MATA-GÓMEZ et al., 2014). São também precursores de vitamina A, reduzindo o risco de doenças degenerativas e alguns tipos de câncer (PONKA, et al., 2015; GRANADO-LORENCIO et al., 2017).

A produção de carotenoides por micro-organismos, através dos processos fermentativos, apresenta algumas vantagens: os pigmentos sintetizados são considerados naturais, alguns micro-organismos são capazes de se desenvolver em substratos de baixo custo, é necessário pequeno espaço para a etapa de síntese, esta não se encontra sujeita a alterações climáticas e, além disso, 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; MATA-GÓMEZ et al., 2014).

Para a produção de biocompostos existem vários processos de obtenção. Os processos em batelada são os mais empregados, sendo também o mais seguro quando se trata de contaminação, mas pode levar a baixos rendimentos. Os processos em biorreator batelada alimentada são considerados eficientes e versáteis em termos de produtividade em células e biocompostos, 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, assim minimizando os efeitos de inibição pelo substrato com potencial para a produção de carotenoides (SCHMIDELL et al., 2001).

Além disso, há possibilidade, neste caso, de utilizar coprodutos agroindustriais de baixo custo na bioprodução de carotenoides como forma de reduzir os custos de produção e a emissão destes subprodutos industriais e agroindustriais no ambiente, considerando que estes são ricos em açúcares e matéria orgânica. No contexto nacional, o Brasil é rico em subprodutos desta natureza o que facilita estes estudos. Dentre esses, podem ser utilizados o soro de queijo (VALDUGA et al., 2009), mosto de uva (BUZZINI e MARTINI, 1999), derivados do processamento da cana-de-açúcar (VALDUGA et al., 2008), do processamento de milho (VALDUGA et al., 2008; LOSS, 2009; HOFER et al., 2018); da produção de azeite de oliva (BORRONI et al., 2017), da produção de biodiesel (RIBEIRO, 2011; SAENGE et al., 2011, MACHADO e BURKERT, 2014; CARDOSO et al., 2016) e da parboilização de arroz (COLET et al., 2015; COLET et al., 2017).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar carotenoides por *Phaffia rhodozyma* com resíduos agroindustriais em frascos agitados, em biorreator batelada e batelada alimentada, pelo desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos:

- Otimizar o meio de bioprodução a base de resíduos agroindustriais (água de maceração de milho, água de parboilização de arroz e glicerol bruto) em frascos agitados;

- Avaliar a bioprodução em biorreator batelada utilizando diferentes taxas de aeração e agitação;
- Maximizar a bioprodução em biorreator batelada através da utilização da melhor condição de aeração e agitação;
- Avaliar a bioprodução em batelada alimentada utilizando diferentes volumes de alimentação de substrato;
- Avaliar a variação do pH ao longo da bioprodução;
- Obter os parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento, da bioprodução de carotenoides e de consumo de substrato nos sistemas batelada e batelada alimentada;
- Identificar os carotenoides produzidos na melhor condição, através de HPLC-DAD/MS-APCI.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados aspectos gerais sobre carotenoides, suas propriedades e funções, produção biotecnológica, além de fatores que influenciam a sua produção. Serão identificados também substratos alternativos de baixo custo que podem ser utilizados na produção biotecnológica de carotenoides e os sistemas de produção disponíveis (batelada, batelada alimentada), bem como aspectos sobre a recuperação, identificação e caracterização dos carotenoides.

2.1 Carotenoides

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis, sendo encontrados em fungos, bactérias, tecidos de plantas verdes e também em animais (MEZZOMO e FERREIRA, 2016). Apresentam capacidade corante, que provem da presença de uma longa série de duplas ligações conjugadas, que é também responsável por suas propriedades antioxidantes (MACÍAS-SANCHEZ et al., 2010).

Os pigmentos compreendem duas classes principais, os carotenos e as xantofilas (Figura 1). Os carotenos consistem em hidrocarbonetos poliênicos cíclicos ou lineares, enquanto as xantofilas são carotenos com pelo menos um átomo de oxigênio funcional ($-OH$ e $=O$) em sua molécula e representam a grande maioria dos carotenoides. Cada carotenoide consiste em diferentes isômeros *cis* e *trans*. As xantofilas, os derivados oxigenados dos carotenos (apenas hidrocarbonetos) são compostos relativamente hidrofílicos devido à presença do grupo hidroxila (LA FUENTE et al., 2006; GONG e BASSI, 2016).

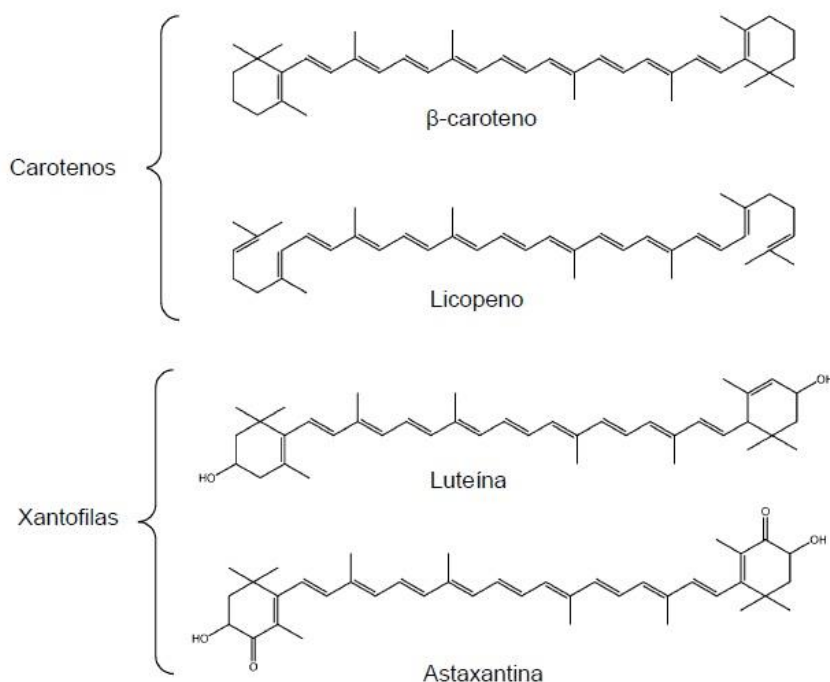
Os carotenoides são os pigmentos mais difundidos na natureza, sendo os mais importantes β -caroteno, luteína e zeaxantina. Na literatura são reportadas mais de 600 variantes estruturais desta família de pigmentos, que se encontram em fontes naturais (FILHO et al., 2008; AUSICH, 1997). Os carotenoides são corantes naturais responsáveis pelas cores vermelha, amarela e laranja, muito empregadas nas indústrias alimentícias, farmacêutica, de cosméticos e até mesmo de ração animal (RODRIGUES-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008; ESTEBAN et al., 2015).

Alguns carotenoides primários como a luteína servem como pigmentos acessórios podendo transferir energia absorvida para clorofilas, expandindo assim, o

espectro de absorção de luz de algas ou plantas. Os carotenoides secundários como a astaxatina e a cantaxantina desempenham papel nos mecanismos de proteção celular. Ao contrário dos carotenoides primários que estão associados a componentes estruturais e funcionais, os secundários são produzidos a níveis elevados e são distribuídos em gotas oleosas. Eles funcionam para formar uma camada protetora quando as células são submetidas a condições de estresse. Alguns carotenoides são encontrados em forma de éster, portanto a saponificação (etapa de extração com o objetivo de remover clorofilas e lipídios para liberar carotenoides para uma melhor análise, livre de formas conjugadas) é necessária após a extração de pigmentos (GONG e BASSI, 2016).

A saponificação também é utilizada para hidrólise de formas esterificadas de carotenoides. As xantofilas esterificadas são menos solúveis em água do que sua forma livre, assim como os carotenos. A estabilidade dos carotenoides aumenta, visto que, ésteres de xantofilas são mais estáveis do que carotenoides livres (MERCADANTE et al., 2017).

Figura 1- Estrutura química dos pigmentos carotenoides.



Fonte: LA FUENTE et al. (2006).

2.1.1 Propriedades e funções dos carotenoides

O interesse no uso de carotenoides está baseado na vantagem de que os mesmos não são afetados (ao contrário de muitos outros corantes) pela presença de ácido ascórbico, ou ciclos de resfriamento. Além disso, são corantes de alto poder colorífico, podendo ser usados até mesmo em partes por milhão (MACÍAS- SANCHEZ et al., 2004).

Nas indústrias de alimentos, o principal objetivo na utilização dos carotenoides é colorir ou repor a cor dos alimentos perdida durante processamento ou armazenamento, e uniformizar a coloração de alguns produtos, levando em consideração que a cor é vista como um indicador de qualidade e consequente aceitação do produto (MALDONADE et al., 2008; JANISZEWSKA-TURAK, 2017). Além disso, uma das características mais importantes dos carotenoides, é a sua capacidade de atuar como antioxidante, protegendo células e tecidos da ação dos radicais livres (SOWMYA; SACHINDRA, 2012; MATA-GÓMEZ et al., 2014), precursor de vitamina A, podendo diminuir o risco de doenças degenerativas, tipos específicos de câncer e formação de catarata (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; PONKA et al., 2015; GRANADO-LORENCIO et al., 2017; SEABRA e PEDROSA, 2010; GOTO et al., 2015).

2.2 Produção biotecnológica de carotenoides

Vários micro-organismos tem a capacidade de produzir carotenoides tais como: *Halobacillus halophilus* (OSAWA et al., 2010), *Thermus thermophilus* (TAKANO et al., 2011), *Phaffia rhodozyma* devido às modernas técnicas de biologia molecular, essa foi reclassificada e pode ser utilizada também a nomenclatura de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (WOZNIAK et al., 2011; MICHELON et al., 2012; SILVA et al., 2016), *Rhodotorula glutinis* (TASKIN e ERDAL, 2011), *Rhodotorula mucilaginosa* (MOLINÉ et al., 2010; YO et al., 2016), *Sporobolomyces poonsookiae* (SA et al., 2013), *Sporidiobolus pararoseus* (VALDUGA et al., 2014), *Sporidiobolus pararoseus* isolada do ecossistema sul-riograndense (MACHADO e BURKERT, 2014), *Sporidiobolus salmonicolor* (COLET et al., 2015 ; COLET et al., 2017 ; VALDUGA et al., 2011). Porém na literatura raros são os micro-organismos que são investigados para produção em biorreator, destacam-se a *Rhodobacter sphaeroides* (NG et al., 2011),

Saccharomyces cerevisiae (YUAN et al., 2011), *S. salmonicolor* (COLET et al., 2015) *R. toluroides* (DIAS et al., 2015) e *R. glutinis* (SAENGE et al., 2011).

A levedura *Phaffia rhodozyma* pertence à classe dos basideomicetos, apresentando células vegetativas elípticas isoladas, podendo formar cadeias curtas ou aos pares. Possui parede celular multicamada, com composição polissacarídica (MILLER et al., 1976). São micro-organismos aeróbios facultativos formadores de colônias vermelho alaranjadas (WAGNER, RAMBLA e LEGARRETA, 2008).

A levedura *Phaffia rhodozyma* se destaca na produção de carotenoides devido à sua capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono como substrato, possuir um metabolismo heterotrófico com taxa de crescimento relativamente rápida, habilidade de atingir alta densidade celular, além de ter sido certificada como GRAS (*generally recognized as safe*) (SILVA et al., 2016).

2.2.1 Principais fatores que influenciam a produção de carotenoides

A produção de carotenoides por micro-organismos é afetada por fatores físicos (temperatura, luminosidade, aeração, agitação e/ou teor de oxigênio) e pela composição do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), os quais variam em intensidade e concentração de acordo com as necessidades que cada micro-organismo possui. Sendo assim, a mudança nesses fatores pode influenciar positiva ou negativamente a biossíntese de pigmentos (BUZZINI et al., 2005; DAS et al., 2007).

A temperatura e o pH exercem influência no crescimento microbiano, metabolismo e na viabilidade celular, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese (ZENI, 2009; MALISORN e SUNTORN SUK, 2008). Na biossíntese de carotenoides naturalmente ocorrem mudanças do pH do meio de bioprodução, como consequência do crescimento do micro-organismo. De modo geral, em leveduras o pH do meio fermentativo decresce nas primeiras 72 h de fermentação, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese (COLET et al., 2015).

Hu et al. (2006) investigaram o efeito do pH no processo de produção de carotenoides pela levedura *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*), com meio de cultivo contendo 80 g/L de glicose e 8 g/L de extrato de levedura, com cultivo em agitador rotatório a 200 rpm, 20°C durante 7 dias, avaliando os pH iniciais de: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0;

5,5; 6,0 e 6,5. O pH adequado para o crescimento celular e produção de astaxantina específica (1,52 mg/g) foi de 6,0.

Hu et al. (2007) estudaram a bioprodução de astaxantina pela levedura *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*) em batelada alimentada com a estratégia de mudança do pH, em meio YM- *Yeast Malt Extract*- (10 g/L de glicose, 3 g/L de extratos de malte e levedura e 5 g/L de peptona), sendo que a máxima concentração de astaxantina foi de 39,47 mg/L em pH 5,0.

A temperatura também exerce influência na produção celular e de carotenoides. Aksu e Eren (2007) estudando a produção de carotenoides com *R. glutinis*, perceberam que a taxa de crescimento específico (125 mg/L) da levedura aumentou com a elevação da temperatura de 25°C para 30°C. A produção de carotenoides também foi influenciada pelo aumento da temperatura, onde até 30 °C foi observado um crescimento acentuado na concentração de carotenoides totais. Estes resultados também corroboram com os obtidos por Ramírez et al. (2001) na produção de astaxantina (810 µg/L) por *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*), onde a temperatura (19,7°C) foi o fator que mais causou influência.

A produção de carotenoides é afetada pela irradiação de luz, contudo, a intensidade e a forma de iluminação variam de acordo com o micro-organismo (BHOSALE, 2004). Em estudos, Jhonson et al. (1979) revelaram que a intensidade luminosa não influenciou a pigmentação de *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*). Já Gil-Hwan e Jhonson (1990), utilizando alta intensidade luminosa, concluíram que a luz inibiu o crescimento celular e a formação de pigmento, ambas causadas pelo estresse celular.

A aeração é um parâmetro importante, visto que, a carotenogênese é um processo aeróbico. Desse modo, o fluxo de ar no cultivo com leveduras é essencial para a assimilação do substrato e consequente crescimento (MATA-GÓMEZ et al., 2014). Esse efeito foi estudado por Davioli et al. (2004) na utilização da levedura *S. roseus*, onde um aumento na aeração causou um incremento significativo (aproximadamente 370%) na concentração de carotenoides. Em estudo realizado por Liu et al. (2006), houve evidências de que o aumento da agitação (200 para 250 rpm) e a diminuição no volume de líquido (50 para 20 mL) ocasionaram elevação no crescimento celular e produção de carotenoides (7,4 mg/L para 15,5 mg/L), sendo que a mudança na velocidade de agitação apresentou maiores efeitos no rendimento de carotenoides nos maiores volumes de líquido.

Maldonado et al. (2008) estudando a composição de carotenoides, das leveduras isoladas no Brasil e cultivadas em meio YM, 200 rpm, 25°C por 5 dias, sem iluminação, encontrou concentrações de carotenoides totais de 881 µg/L para *R. glutinis*, 594 µg/L para *R. graminis*-125, 590 µg/L para *R. mucilaginosa*-137, 545 µg/L para *R. mucilaginosa*-135, 168 µg/L para *R. minuta* e 237 µg/L para *Sporobolomyces* sp. Os principais pigmentos encontrados nestas linhagens foram toruleno e β-caroteno, sendo o β-caroteno predominante em *R. graminis*-125, *R. glutinis* e *Sporobolomyces* sp., enquanto que o toruleno foi o carotenoide principal de *R. mucilaginosa*.

A composição do meio de cultivo influencia na produção celular e de carotenoides. A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides. Sutherland et al. (1996) verificaram que concentrações altas de glicose inibem a carotenogênese, enquanto que a sacarose, maltose e celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados na produção de astaxantina por *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*).

Em cultivo de *S. salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados, Valduga et al. (2009b) verificaram que o teor de carotenoides totais e a produção específica aumentaram com a elevação das concentrações de glicose, extrato de malte e peptona, obtendo o teor máximo de carotenoides totais de 1019 µg/L no ensaio com 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona. Valduga et al. (2008) ao utilizarem substratos agroindustriais pré-tratados na bioprodução por *S. salmonicolor*, obtiveram um teor de carotenoides totais de 541,5 µg/L, com concentrações de melaço de cana-de-açúcar de 10 g/L, água de maceração de milho de 5 g/L e hidrolisado de levedura de 5 g/L.

Fontes de nitrogênio também afetam o crescimento e a pigmentação em *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*). A peptona foi considerada melhor fonte de nitrogênio para pigmentação, entretanto, estudos relataram que o uso do extrato de leveduras como fonte de nitrogênio aumentou a concentração de carotenoides totais (MEYER e PREEZ, 1994).

A síntese dos carotenoides começa no final da fase logarítmica seguindo para a fase estacionária. A presença de uma fonte de carbono durável é de extrema importância para a biossíntese durante a fase estacionária (RAMÍREZ et al., 2006; LATHA et al., 2005).

O uso de substratos industriais de menor custo como fonte de nutrientes e a adequação das características de meio de cultivo fazem com que esse processo se torne industrialmente praticável, reduzindo assim o custo de produção (DAS et al., 2007; BUZZINI et al., 2005). Há também, relatos da utilização de outros substratos alternativos como melaço (BHOSALE e GADRE, 2001; VALDUGA et al., 2008), soro de queijo (FRENGOVA et al., 1994; AKSU e EREN, 2005; VALDUGA et al., 2009), o mosto de uva (BUZZINI e MARTINI, 1999), derivados do processamento da cana-de-açúcar (FONTANA et al., 1996; VALDUGA et al., 2008) e glicerol (CARDOSO et al., 2016).

O aumento na produção de biocombustíveis como fonte alternativa de energia tem contribuído para a geração de resíduos de glicerol. Estima-se que a cada ano, a produção de biodiesel aumentará em torno de 42% (STASIAK-RÓSKA et al., 2017). Dessa forma, destinar esse resíduo para utilização como substrato pode ajudar a evitar um problema ambiental. Além disso, o glicerol tem se destacado por ser 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 (ITO et al., 2005; CHENG et al., 2007).

Cardoso et al. (2016), em estudo de produção de carotenoides da levedura *S. ruberrimus* utilizando glicerol, obtiveram melhores resultados de concentração (0,51 g/L) e produtividade (0,0064 g/L h) de carotenoides quando glicerol bruto foi utilizado como fonte de carbono, o que representou aumento de 27% e 1,5 vezes, em relação ao glicerol comercial, respectivamente.

Outro substrato alternativo com potencial é a água de maceração de milho, um coproduto do processamento de milho contendo 40% de sólidos totais, constitui uma excelente fonte de nitrogênio, carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais vitaminas e fosfato, tornando-se um substrato favorável aos processos fermentativos se comparada ao extrato de levedura (meio sintético utilizado como fonte de nitrogênio) (RIVAS et al., 2004; LIU et al., 2015).

Outro substrato alternativo com potencial para a produção de biocompostos é a água de parboilização de arroz. O Brasil é gerador de grande quantidade deste resíduo agroindustrial sendo em média 0,83 L de efluente por quilo de arroz em casca. Este substrato contém grandes quantidades de substâncias orgânicas e nutrientes como nitrogênio e fósforo (FARIA et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2016).

2.2.2 Sistemas de bioprodução de carotenoides

A maioria dos processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos em frascos agitados e a utilização industrial dependerá da capacidade de ampliar esses processos. Os biorreatores apresentam-se, assim, como uma alternativa ao desenvolvimento dos bioprocessos pois fornecem um ambiente favorável ao crescimento dos micro-organismos (MANOWATTANA et al., 2018).

Quando se trata de bioprodução em reatores, diversos sistemas podem ser adotados: descontínuo (batelada), semi-contínuo, descontínuo alimentado (batelada alimentada) ou contínuo. Os processos em batelada são os mais empregados para a obtenção de biocompostos, é o mais seguro quando se trata de contaminação, mas pode levar a baixos rendimentos, pois algumas vezes, há excesso de substrato no processo que pode causar efeitos de inibição ou produção de compostos secundários que não interessam ao processo. No entanto, o processo em batelada como a adição de nutrientes é realizada em períodos intermitentes de cultivo, neste caso possui a capacidade de controlar a concentração de substrato no biorreator, levando ao acúmulo de um produto específico (desejado). No processo semicontínuo, tanto o fluxo de entrada do meio no reator quando o de saída, são intermitentes. Quando se trata de fermentação contínua, há uma vazão constante de alimentação de meio de cultura e uma retirada contínua do produto já fermentado, esse processo pode ser operado por longos períodos em estado estacionário, no entanto, nem sempre é interessante de acordo com o produto de interesse (SCHMIDELL et al., 2001; LUNA-FLORES et al., 2010).

2.2.3.1 Sistema batelada simples

Os processos descontínuos ou chamados de bateladas podem ser operadas da seguinte maneira: no instante inicial o mosto preparado esterilizado no fermentador é inoculado com micro-organismos e incubado de maneira a permitir que a fermentação ocorra sob condições controladas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos, antiespumante, ácido ou base para controle do pH. Ao final do processo fermentativo descarrega-se a dorna e o meio fermentado segue para os tratamentos finais.

A fermentação descontínua apresenta menores riscos de contaminação (quando comparados com processos contínuos de fermentação), grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para fabricação de diferentes produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (SCHMIDELL et al., 2001; MATA-GÓMEZ et al., 2014).

2.2.3.2 Sistema batelada alimentada

O sistema 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., 2008). Esse processo é utilizado com objetivo de superar os problemas para obtenção de carotenoides em relação a inibição da produção pela concentração de substrato ou por repressão catabólica.

O principal propósito da batelada alimentada é controlar a concentração do substrato no meio de cultura. Para isso, 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. Uma boa estratégia para condução da fermentação em batelada alimentada com diversos tipos de micro-organismos é a alimentação de substrato limitante na mesma velocidade que este é utilizado pelo micro-organismo (MEARS et al., 2017).

A característica básica dos processos microbianos em batelada alimentada é que as concentrações de nutrientes alimentados no biorreator podem ser controladas por mudanças na velocidade de alimentação. O uso do glicerol bruto foi estudado por Saenge et al. (2011), como a única fonte de carbono para a produção de lipídeos e carotenoides pela levedura *R. glutinis*. A maior concentração de biomassa obtida em 8,5% de glicerol e proporção de carbono/nitrogênio de 60, enquanto que para teores de lipídios e produção de carotenoides a concentração de glicerol foi de 9,5 % e a relação C/N de 85. Em fermentação em batelada alimentada, iniciada no meio da fase exponencial e a cada 12 h para manter a concentração de glicerol, foram adicionados

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

Colet et al. (2015), utilizando batelada alimentada na bioprodução de carotenoides de *S. salmonicolor*, obteve máxima concentração de carotenoides totais (4400 µg/L) em 96 horas de processo, com uma alimentação de 112,5 mL a cada 12 h, sendo que a primeira alimentação foi feita com 24 h de processo. O rendimento na batelada alimentada foi 29% maior do que o obtido em batelada simples.

Dessa forma, a opção de conduzir a bioprodução de carotenoides utilizando batelada alimentada leva a uma melhoria na produção do metabólito de interesse, fazendo com que esse tipo de processo resulte em um incremento na produtividade final.

2.3 Recuperação de biocompostos

Há interesse comercial na bioprodução industrial de carotenoides e por metodologias de recuperação eficazes e de baixo custo, no entanto, as etapas de recuperação e extração do produto ainda carecem de técnicas alternativas principalmente em processos de produção de carotenoides intracelular, visando a otimização da recuperação e, conseqüentemente contribuindo para a redução de custos operacionais.

A parede celular é uma camada relativamente rígida presente nas células de vegetais e micro-organismos como bactérias, algas, fungos e leveduras. Ela fornece suporte osmótico e determina o formato da célula, além de estar relacionada a sinalização celular, adesão e digestão extracelular (MAGNELLI et al., 2005).

As leveduras são envolvidas por uma rígida parede celular, representando cerca de 20 a 25% do peso seco da célula. Em uma grande parte das leveduras, a parede celular consiste em 85 a 90% de polissacarídeos e 10 a 15% de proteínas (NGUYEN; FLEET e ROGERS, 1998). A maior parte dos carotenoides bioproduzidos se encontram na parte interna das células, sendo assim para que os carotenoides possam ser extraídos, essa parede deverá ser eficazmente quebrada (MICHELON et al., 2012).

O processo de extração de carotenoides com solventes orgânicos é um dos métodos mais utilizados (ZAGHDOUDI et al., 2015). Park et al. (2007) relataram que a extração do carotenoide presente na parede celular do micro-organismo depende da habilidade de permeabilização do solvente através da parede celular e da solubilidade dos carotenoides com o solvente utilizado. Porém, com o aumento da restrição ao uso de solventes, por vezes tóxicos, o interesse dos consumidores por produtos naturais, promoveu a busca por outros métodos de extração (SUN e TEMELLI, 2006).

Michelon et al. (2012) comparou o efeito de diferentes técnicas de ruptura celular (físicos, químicos, enzimáticos e métodos combinados) para extração de carotenoides de *Phaffia rhodozyma*, obtendo melhores resultados (195,35µg/g) ao empregar técnica combinada de maceração de biomassa congelada com terra diatomácea e lise enzimática.

Outra técnica que pode ser empregada no rompimento celular é o sistema ultrassônico, que consiste em um processo que utiliza energia das ondas ultrassônicas que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz). As ondas de ultrassom se propagam na matéria, criando meios de compressão e expansão, fazendo com que as moléculas se afastem e se aproximem (LUQUE-GARCÍA e DE CASTRO, 2003; LUENGO et al., 2014). O ultrassom aumenta a permeabilidade da parede celular, a produção de cavitação, resultando em um forte estresse dinâmico, e conseqüentemente o aumento do estresse mecânico das células, também chamado de fricção interfacial. As ondas ultrassônicas rompem as paredes celulares, aumentando a penetração do solvente e o contato entre as fases soluto/solvente e assim, facilitando a liberação dos extratos (JACQUES et al., 2007; MA et al., 2008; SHIRSATH et al., 2012). Além disso, o ultrassom pode ser utilizado para melhorar efetivamente a taxa de extração, aumentando as taxas de transferência de massa e possível ruptura da parede celular devido à formação de microcavidades levando a maiores rendimentos com tempos e consumo de solventes reduzidos (SHIRSATH et al., 2012).

Em estudo de extração de carotenoides de *X. dendrorhous*, Urnau et al. (2017), obteve teores máximos de recuperação 697 µg/g, em meio de bioprodução empregando para ruptura celular o sistema ultrassônico (40 KHz, 56 min e 22°C), e extração com a mistura acetona: metanol (7:3, v/v).

Silva (2009), avaliando ruptura celular da levedura *P. rhodozyma*, utilizando o método de autólise de células liofilizadas com dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneização em vórtex obteve níveis máximos de recuperação de 538 µg/g de carotenoides específicos.

Após o rompimento celular, os carotenoides devem ser extraídos a partir da célula microbiana. Como os carotenoides são lipossolúveis, geralmente são extraídos com solventes orgânicos, como acetona, éter de petróleo, hexano, etanol (MENDES-PINTO et al., 2010). A seleção de um solvente é de extrema importância para obtenção de extratos de boa qualidade e, além disso, não deve ser inflamável, não tóxico e não volátil. No entanto, até hoje, não tem se encontrado solvente com tais características (CAMARGO, 2010).

Alguns estudos têm testado a habilidade dos solventes para isolar carotenoides de células microbianas. A maioria desses estudos estão focados em testar a recuperação de carotenoides utilizando apenas um solvente. Uma área que tem recebido atenção é a mistura sinérgica desses solventes, com o objetivo de uma melhor extração (LIM et al., 2002). Monks et al. (2011) testaram mistura de acetona: metanol (7:3 v/v), etanol: diclorometano (1:3 v/v) e etanol: acetato de etila (1:3 v/v), obtendo melhores resultados para acetona: metanol, com um conteúdo de carotenoides de 2875,23 µg/L.

2.4 Caracterização de carotenoides

A instabilidade devido à presença de luz, oxigênio e calor, pode dificultar a identificação dos carotenoides. Os carotenoides de estrutura conhecida podem ser conclusivamente identificados mediante, no mínimo 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 (DELGADO-VARGAS e PAREDES-LÓPEZ, 2003; MERCADANTE, 2008; RODRIGUES et al., 2016).

Técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS) fornecem, concomitantemente, informações a respeito do cromóforo e do peso

molecular de cada composto individualmente (FARIA et al., 2009; ZEPKA e MERCADANTE, 2009). A identificação de carotenoides pode ser realizada pela comparação dos tempos de retenção e espectro de absorção dos picos desconhecidos com a comparação aos padrões de referência. Para a quantificação dos carotenoides são utilizadas curvas analíticas com soluções padrão dos compostos na absorção específica máxima.

2.5 Considerações Finais

Após as considerações apresentadas, verifica-se a importância de se obter carotenoides de fontes biotecnológicas e naturais, tendo em vista seu grande emprego na área alimentícia e farmacêutica. Além disso, estratégias de redução de custos através da utilização de meios de menor custo tais como resíduos agroindustriais e o aumento da escala de produtividade.

Constatou-se a possibilidade do uso de resíduos e subprodutos como fonte de nutrientes na produção de carotenoides, buscando a redução de custos de produção dos pigmentos. O glicerol apresenta-se como uma fonte de carbono menos dispendiosa além de abundante, devido à sua geração como coproduto na produção de biodiesel. Outras fontes de relevante importância são a água de maceração de milho e de parboilização de arroz, considerando-se que o Brasil é grande produtor desses cereais.

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

Dessa forma, o presente trabalho apresenta grande relevância, visto que, a produção de corantes naturais é uma alternativa ao uso de compostos sintéticos, bastante prejudiciais à saúde. Além disso, nesse tipo de produção é possível utilizar subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes, tornando o processo menos dispendioso e sustentável. O estudo de diferentes processos (batelada e batelada alimentada) permite o *scale-up* do processo, o que o torna industrialmente praticável.

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 *P. rhodozyma* em frascos agitados, biorreator batelada simples e alimentada utilizando resíduos agroindustriais. Também serão detalhadas as etapas de identificação e caracterização dos carotenoides.

Primeiramente será descrita a bioprodução em frascos agitados e a otimização do meio de cultura com utilização de resíduos agroindustriais. Posteriormente serão avaliados os parâmetros agitação e aeração em biorreator, afim de maximizar a bioprodução. Utilizando os valores ótimos de agitação e aeração será realizada uma bioprodução em processo batelada simples, onde serão coletadas amostras do meio a cada 12 h a fim de construir curva cinética e obter parâmetros estequiométricos. Em seguida, com o intuito de obter maiores rendimentos, será realizada a bioprodução em regime batelada alimentada, em que serão utilizados diferentes volumes de alimentação (50, 75, 112,5 e 150 mL) objetivando o estudo de consumo de substrato, produção de biomassa e carotenoides, e da mesma forma, construir curva cinética e obter parâmetros estequiométricos.

3.1 Micro-organismo e meio de cultura

3.1.1 Micro-organismo

A produção de carotenoides foi realizada com a levedura *Phaffia rhodozyma* Y-17268, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG-Universidade Federal de Rio Grande.

3.1.2 Manutenção e reativação da cultura microbiana

A levedura foi mantida em ágar YMA (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 20 g/L de ágar) inclinado, adicionados de KNO_3 a 4°C. Para a reativação a partir da cultura estoque foram realizados repiques para tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48 h/25°C. Em seguida, realizou-se uma resuspensão celular em 1 mL de água

peptonada e a mesma foi adicionada em 9 mL de meio YM, sendo incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.1.3 Preparo do inoculo

Para o preparo do inoculo, uma alçada de células da cultura estoque foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM (*Yeast Malt Extract*) composto por: 3 g/L de extrato de levedura (Vetec), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L de peptona (Himedia) e 10 g/L de glicose (Vetec). O meio foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min, e então, realizou-se a incubação em agitador orbital a 25°C, 180 rpm por aproximadamente 48 h.

3.1.4 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 bruto (Lote 1- subproduto da produção de biodiesel produzido no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI Erechim, Lote 2- cedido pela Olfar) e Prodex Lac® Sd (hidrolisado de levedura), cedida pela Empresa Bio Springer de Valinhos/SP.

Um pré-tratamento com objetivo de remover constituintes indesejáveis não comprometendo a obtenção de carotenoides foi realizado quando os substratos apresentavam-se com coloração escura e/ou com presença de materiais em suspensão, devido ao fato de os meios agroindustriais apresentarem composição complexa, e alguns de seus componentes poderem ser responsáveis pela inibição da produção de carotenoides, ou ainda, dificultarem sua posterior recuperação devido à formação de precipitados no meio de bioprodução e/ou pela presença de pigmentos que poderão ser extraídos com os carotenoides.

No pré-tratamento realizado na água de maceração de milho foi empregado um 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 a 2650 x g 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 passaram pela etapa de pré-tratamento, pois apresentavam-se sem materiais em suspensão e aparentemente sem resíduos adicionais que pudessem interferir na produção e/ou extração dos carotenoides.

3.1.4.1 Caracterização dos substratos agroindustriais

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

- a) O teor de Carbono Orgânico Total (COT) 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 Maximização da 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. A cada frasco foram transferidos 10 mL do inoculo, contendo 90 mL de meio de cultura com composição definida conforme os níveis do planejamento (Tabela 1) e fixando-se as variáveis temperatura (25°C), agitação (150 rpm), tempo de bioprodução (96 h) e pH inicial de 4,0 (URNAU et al., 2018).

As faixas utilizadas no planejamento basearam-se em trabalhos anteriores do grupo.

Tabela 1- Variáveis e níveis estudados no planejamento do tipo Plackett Burman (*Screening design*) para a bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis		
		-1	0	1
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 (g/L)	X ₃	40	60	80
Extrato de levedura - Prodex® (g/L)	X ₄	0	2,5	5

*Variáveis independentes fixas: 150 rpm, 25°C, 96 h e pH inicial 4,0.

Baseado nos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett Burman (Tabela 1), planejamento sequencial - planejamento fatorial completo 2² foi realizado visando maximizar e/ou otimizar a bioprodução de carotenoides (Tabela 2). A variável dependente (resposta) foi a concentração de carotenoides específicos.

Tabela 2- Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2² para a bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Água de maceração de milho (g/L) - AMM	X ₁	71,8	80	100	120	128,2
Glicerol g/L	X ₂	71,8	80	100	120	128,2

*Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 96 h e APA 20 g/L.

3.2.2 Bioprodução em biorreator

Os ensaios da bioprodução de carotenoides em sistema batelada simples foram realizados em Biorreator Biostat B (Braun Biotech International) de 2 L, por 96 h, em ambiente com 1,2 lux, conforme mostra a Figura 2. Os parâmetros monitorados foram agitação e aeração. O antiespumante FG 10 Dow Corning utilizado, foi previamente esterilizado em frasco em ultravioleta durante 40 min.

Figura 2- Imagem do biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides.



Fonte: Colet (2016).

Baseado nos resultados dos planejamentos experimentais em frascos agitados, definiu-se o meio da bioprodução em biorreator. Um volume inicial de 900 mL do meio de cultura (100 g/L de glicerol, 100 g/L de AMM e 20 g/L de APA) adicionado no frasco do biorreator foi autoclavado (Phoenix, modelo AV75). Após o resfriamento do sistema, foram adicionados 100 mL do pré-inóculo, e as condições no biorreator foram ajustadas em pH inicial 4,0, temperatura de 25°C, a agitação e aeração foram variadas utilizando-se um planejamento fatorial completo 2^2 (Tabela 3). A variável dependente (resposta) foi a concentração de carotenoides específicos. Os níveis foram definidos a partir de trabalhos anteriores do grupo.

Tabela 3- Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para bioprodução de carotenoides em biorreator batelada simples por *P. rhodozyma*.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Aeração (vvm)	X ₁	0,8	1	1,5	2	2,2
Agitação (rpm)	X ₂	25	70	180	290	335

*Variáveis Independentes Fixas: 25°C, pH inicial 4,0, 96 h.

3.2.3 Bioprodução em biorreator batelada alimentada

Os ensaios da bioprodução de carotenoides em batelada alimentada foram realizados em Biorreator Biostat B (Braun Biotech International) com volume total de 2 L por 96 h.

Baseado nos resultados do planejamento experimental em batelada, definiram-se os parâmetros agitação e aeração utilizando o mesmo meio de cultivo.

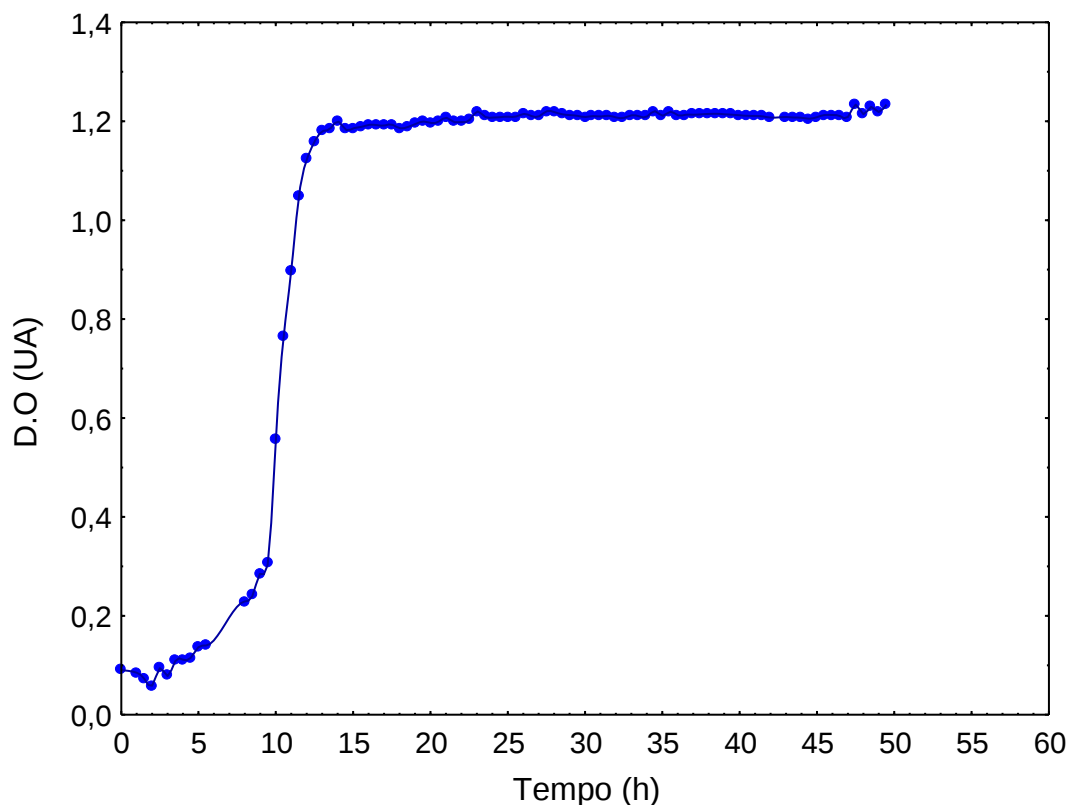
O sistema de batelada alimentada foi conduzido com adição do meio de cultivo a cada 12 h (Tabela 4) considerando os resultados na curva de crescimento (definida em estudos anteriores), onde a biomassa mantinha-se praticamente constante (Figura 3), sendo este ponto o final da fase exponencial (12 h) de crescimento celular. As respostas avaliadas foram o teor de carotenoides totais e específicos.

Tabela 4- Volume de alimentação de meio no biorreator a cada 12 h de bioprodução.

Ensaio	Volume de Alimentação (mL/12h)*
1	50
2	75
3	112,5
4	150

*Variáveis fixas: aeração de 1,5 vvm, 250 rpm, 25°C, 96 h, pH inicial de 4,0.

Figura 3- Curva de crescimento celular da levedura *Phaffia rhodozyma* durante 50 h de cultivo em frascos agitados com meio YM em função da densidade ótica (DO).



Fonte: URNAU, 2014.

3.3 Recuperação de carotenoides

Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 4478 x g, 5°C por 10 min e realizada lavagem com éter etílico para remoção de resíduos de glicerol na célula. As mesmas foram congeladas em freezer a -80°C por 5 h e secas em liofilizador (Edward) por 36 h. Após a liofilização, a quantidade de biomassa produzida foi quantificada em balança semi-analítica (Shimadzu AY220).

Para o rompimento celular utilizou-se 0,05 g de células liofilizadas, nas quais adicionou-se 2 mL de dimetilsufóxido – DMSO. As amostras foram submetidas a homogeneização em agitador orbital (Newbruswick) a 150 rpm, 35°C por 60 min (URNAU et al., 2017). Em seguida, foram adicionados 4 mL de acetona, seguido de centrifugações (Elettrofor MPW 351R) (4478 x g, 5°C, 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células apresentem-se sem coloração. Nas fases solventes (sobrenadante) foram

adicionados 10 mL da solução de cloreto de sódio 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases foi realizado uma filtração com a adição de 2 g de sulfato de sódio e retirada a fase sobrenadante com o auxílio de uma pipeta (BONFIM, 1999). Posteriormente, os pigmentos foram quantificados pelo método espectrofotométrico.

3.4 Determinações analíticas

3.4.1 Determinação dos carotenoides específicos

A absorbância da amostra após extração foi medida em espectrofotômetro (Agilent). A concentração total de carotenoides foi estimada através do valor medido da máxima absorbância a 474 nm, utilizando a equação descrita por Davies (1976). Os coeficientes de absorbância utilizados foram referentes a astaxantina: ($E_{1cm}^{1\%} = 2100$) e ao beta-caroteno ($E_{1cm}^{1\%} = 2592$) para o éter de petróleo (DAVIES, 1976).

Os resultados da concentração de carotenoides foram expressos em termos de carotenoides específicos através da Equação 1:

$$CE = \frac{A * V * 10^6}{A_{1cm}^{1\%} * 100 * m} \quad (1)$$

Onde:

CE é a concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$). A é a absorbância, V é o volume de corante produzido, $A_{1cm}^{1\%}$ é o coeficiente de extinção e m é a massa de amostra utilizada.

3.4.2 Determinação de carotenoides totais

Para determinação de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) levou-se em consideração o teor de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) e a produção de células em um litro de meio de cultura (g/L).

3.4.3 pH

A evolução do pH durante a bioprodução foi acompanhada utilizando pHmetro digital (Digimed DMPH- 2) e o pH inicial dos meios de cultivo foi ajustado em 4,0 com solução de HCl 2 mol/L.

3.4.4 Teor de glicerol do meio

A determinação da concentração de glicerol seguiu o método descrito por Cocks e 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 foi quantificado por titulação da amostra com hidróxido de sódio (NaOH) 0,125 mol/L.

Inicialmente, adicionou-se 50 mL de água destilada e 10 mL de amostra em Erlenmeyer, 5 gotas de azul bromotimol, 1 gota de H₂SO₄ 0,4 mol/L e NaOH 0,05 mol/L até mudança de coloração (azul), e 100 mL de periodato (concentração de 60 g/L). 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 2.

$$\text{Glicerol} = \frac{9,209 \times M (T_1 - T_2) \times 10}{W} \quad (2)$$

Onde:

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) da amostra.

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

Os teores de Carbono Orgânico Total (COT) e Nitrogênio Total (NT) foram determinados conforme metodologia descrita no item 3.1.3.1.

3.5 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 de meio a cada 12 h no processo batelada, 50 mL a cada 12 h antes da alimentação e 25 mL a cada 12 h após alimentação, para o processo de batelada alimentada, das amostras do meio de bioprodução, possibilitando assim, a posterior construção das curvas cinéticas para cada condição de cultivo.

3.5.1 Velocidades instantâneas e específicas globais

A partir dos perfis de concentração celular global, formação de produto global e consumo de substrato global (glicerol, nitrogênio e carbono orgânico) em relação ao tempo, é possível determinar, por um balanço de massa para cada componente, as velocidades de crescimento microbiano (r_x), formação de produto (r_p) e consumo de substrato (r_g , r_n e r_c) descritas nas Equações 3 a 7, conforme descritas por Bailey e Ollis (1986).

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (4)$$

$$r_g = -\frac{dG}{dt} \quad (5)$$

$$r_n = -\frac{dN}{dt} \quad (6)$$

$$r_c = -\frac{dC}{dt} \quad (7)$$

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular naquele instante, obtém-se as velocidades específicas de crescimento (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_g , μ_n e μ_c), que serão expressas pelas equações 8 a 12 (h^{-1}), descritas por Bailey e Ollis (1986):

$$\mu_x = \frac{r_x}{X} \quad (8)$$

$$\mu_p = \frac{r_p}{X} \quad (9)$$

$$\mu_g = \frac{r_g}{X} \quad (10)$$

$$\mu_n = \frac{r_n}{X} \quad (11)$$

$$\mu_c = \frac{r_c}{X} \quad (12)$$

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

3.5.2 Fatores de conversão global

3.5.2.1 Produto

O fator de conversão de glicerol global em carotenoides produto, $Y_{P/G}$ (μg de carotenoides/g de glicerol), foi expresso pela Equação 13.

$$Y_{P/G} = \frac{r_p}{r_g} = -\frac{dP}{dG} \quad (13)$$

O fator de conversão de nitrogênio global em carotenoides, $Y_{P/N}$ (μg de carotenoides/g de nitrogênio), foi expresso pela Equação 14.

$$Y_{P/N} = \frac{r_p}{r_n} = -\frac{dP}{dN} \quad (14)$$

O fator de conversão de carbono orgânico global em carotenoides, $Y_{P/C}$ (μg de carotenoides/g de carbono orgânico), foi expresso pela Equação 15.

$$Y_{P/C} = \frac{r_p}{r_c} = -\frac{dP}{dC} \quad (15)$$

3.5.2.2 Fatores de conversão celular

O fator de conversão de glicerol global em células, $Y_{X/G}$ (g de células/g de glicerol), foi expresso pela Equação 16.

$$Y_{X/G} = \frac{r_x}{r_g} = \frac{dX}{dG} \quad (16)$$

O fator de conversão de nitrogênio global em células, $Y_{X/N}$ (g de células/g de nitrogênio), foi expresso pela Equação 17.

$$Y_{X/N} = \frac{r_x}{r_n} = -\frac{dX}{dN} \quad (17)$$

O fator de conversão de carbono orgânico global em células, $Y_{X/C}$ (g de células/g de carbono orgânico), foi expresso pela Equação 18.

$$Y_{X/C} = \frac{r_x}{r_c} = -\frac{dX}{dC} \quad (18)$$

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 19.

$$Y_{P/X} = \frac{r_p}{r_x} = \frac{dP}{dX} \quad (19)$$

Onde:

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

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

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

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

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

3.5.3 Produtividade global

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

3.6 Análise dos carotenoides por HPLC

3.6.1 Preparo das amostras

Os carotenoides foram extraídos das amostras com as melhores condições de bioprodução para os sistemas. Do extrato foi evaporado o solvente através de injeção de nitrogênio comprimido. O preparo das amostras seguiu metodologia descrita por Rodrigues et al. (2013) onde as mesmas foram transferidas para uma mistura de éter de petróleo/éter dietílico (1:1, v/v), e saponificadas com 10% de hidróxido de potássio (KOH) em metanol (m/v) por 16 h, em mesa agitadora à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, o extrato foi lavado com água destilada até obter-se pH neutro nas amostras, com subsequente adição de sulfato de sódio anidro para remoção da umidade, e remoção de solvente em evaporador rotativo ($T < 30^\circ\text{C}$). O extrato seco ficou armazenado a -80°C sob atmosfera de nitrogênio (99,9% de pureza) em ultra freezer em frasco âmbar envolto com papel alumínio (ao abrigo da luz) até a realização das análises.

Para determinar a composição dos carotenoides, a amostra foi evaporada sob um fluxo de N_2 , e foi novamente suspensa em uma mistura de metanol e éter metil terc-butílico (MTBE) (50:50, v/v), submetida a ultrassom por 30 segundos, filtrada com

filtro de membrana (PVDF- 0,45 μm) analisada por HPLC-DAD-MS. Para evitar a degradação dos carotenoides durante as análises, a manipulação das amostras foi feita com pouca luz em um ambiente com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 3$).

3.6.2 Preparo 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. A partir da solução estoque, foram realizadas as diluições para o preparo da curva analítica. Foi adicionada a alíquota da solução estoque, seca com N_2 , e ressuspensa em 4 mL de uma solução de metanol:MTBE (1:1) 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.

3.6.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectro de massas (HPLC-DAD e HPLC-DAD/MS-APCI)

A análise da solução padrão (β -caroteno) e das amostras foi baseada na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição cromatográfica em coluna de fase reversa C_{30} , 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 (DIPRAT et al., 2016; DA SILVA et al., 2014; COLET et al., 2017; MURILLO, 2018; WANG et al., 2018).

As análises foram realizadas utilizando HPLC Shimadzu, 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 foi 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 metanol: MTBE (1:1 v:v) e filtradas em membrana de polietileno de 0,22 μm (Millipore, EUA), antes da análise. Considerando colunas de fase reversa, a C_{30} 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, 2008). Por esta razão, a separação dos compostos foi realizada em coluna C_{30} 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 de acordo com o seguinte gradiente: (0-67 min) 0 min, 5 % fase B; 30 min, 30 % fase B; 50 min, 50 % fase B; 60 min, 50 % fase B; 62 min, 5 % fase B; 67 min, 5 % fase B.

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.

3.7 Análise estatística

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 5.0.

Os efeitos das variáveis investigadas dos planejamentos de experimentos foram estatisticamente tratados utilizando metodologia de planejamentos, empregando *software* STATISTICA versão 5.0, com nível de confiança de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos, bem como discussão em relação à dados já reportados na literatura. Inicialmente são apresentados dados sobre a maximização da bioprodução em frascos agitados utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato. Em seguida, resultados em biorreator variando-se agitação e aeração, parâmetros cinéticos e estequiométricos também são apresentados, além de dados referentes à produção em biorreator regime batelada alimentada utilizando diferentes volumes de alimentação.

4.1 Caracterização de substratos agroindustriais

A Tabela 5 apresenta os resultados da densidade óptica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio dos substratos agroindustriais (brutos e/ou pré tratados) utilizados como componentes do meio de bioprodução de carotenoides.

Tabela 5- Densidade óptica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) da água de maceração de milho com tratamento (AMMt) e sem tratamento (AMMs) ácido, água de parboilização de arroz (APA) e do glicerol bruto.

Tratamento	D.O (448 nm)	COT (mg/L)	NT (mg/L)
AMMs	0,238 ^a ± 0,001	21648,2 ^b ± 115,0	4371,3 ^a ± 128
AMMt	0,198 ^b ± 0,001	18979,8 ^c ± 182,8	3643,9 ^b ± 92,7
APA	0,125 ^c ± 0,001	743,2 ^d ± 68,5	124,8 ^d ± 0,9
Glicerol Bruto (L ₁)	0,009 ^d ± 0,001	434669,0 ^a ± 300,0	261,4 ^c ± 22,0
Glicerol Bruto (L ₂)	0,0072 ^d ± 0,002	390252,5 ^a ± 231,0	247,24 ^c ± 27,0

*Média ± desvio padrão, seguida de letras iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa á nível de 5% (Teste de Tukey). L₁: resíduo da produção de biodiesel do laboratório de Termodinâmica da URI Erechim; L₂: resíduo da produção de biodiesel, gentilmente cedido pela Olfar/ Erechim-RS.

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

O pré-tratamento ácido da água de maceração de milho acarretou perdas de 12,33 % na concentração de COT, 16,64 % para o NT e 16,7 % para a D.O. Estes resultados demonstram que o tratamento com ácido fosfórico apresentou efeito complexante de substâncias pigmentadas e de impurezas, contribuindo assim com a clarificação do substrato agroindustrial, com diminuição efetiva da D.O. Dessa forma, optou-se pela utilização da AMM tratada. Bhosale (2004) justifica o fato, mostrando que isso ocorre devido à presença de metais pesados no meio e outros interferentes (íons, sais e etc.). Alguns destes componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção e também dificultar posterior recuperação de bioprodutos.

De acordo com a tabela 5 pode-se perceber que não houve diferença significativa na caracterização dos diferentes lotes de glicerol utilizados na realização dos experimentos. Tal fato apresentou efeito positivo, pois o uso de diferentes lotes não apresentou interferência nos resultados obtidos.

4.2 Batelada simples em frascos agitados

Com a finalidade de estudar o comportamento da levedura perante substratos agroindustriais para a bioprodução de carotenoides, um planejamento de experimentos do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) foi realizado empregando diferentes substratos (glicerol, AMM tratada, água de parboilização de arroz e prodex) em frascos agitados, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 6, onde a máxima concentração de carotenoides específicos e totais foi de 195,51 $\mu\text{g/g}$ e 508,32 $\mu\text{g/L}$ (Ensaio 3) respectivamente, em meio composto por 80 g/L de AMM, 60 g/L de APA e 80 g/L de glicerol.

Tabela 6- Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) com valores codificados (reais) e resposta em termos de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) e totais ($\mu\text{g/L}$) produzidos por *P. rhodozyma* Y-17268 em frascos agitados.

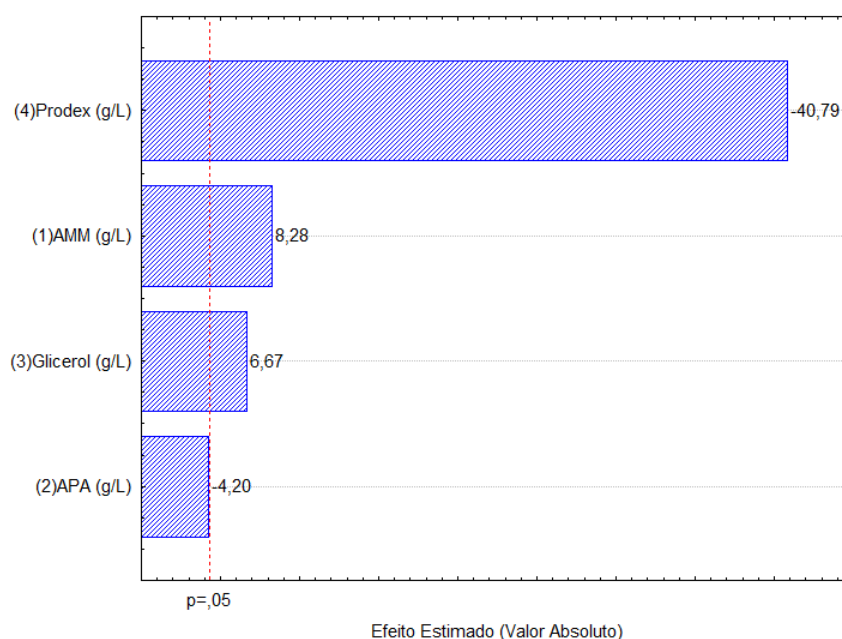
Ensaio	Variáveis Independentes*				Carotenoides Específicos ($\mu\text{g/g}$)	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)
	X₁	X₂	X₃	X₄		
1	1 (80)	-1 (20)	-1 (40)	1 (5)	111,15	222,30
2	1 (80)	1 (60)	-1 (40)	-1 (0)	93,67	159,24
3	1 (80)	1 (60)	1 (80)	-1 (0)	195,51	508,32
4	-1 (40)	1 (60)	1 (80)	1 (5)	22,61	11,30
5	1 (80)	-1 (20)	1 (80)	1 (5)	22,80	12,04
6	-1 (40)	1 (60)	-1 (40)	1 (5)	58,33	62,41
7	-1 (40)	-1 (20)	1 (80)	-1 (0)	175,37	420,89
8	-1 (40)	-1 (20)	-1 (40)	-1 (0)	96,52	166,98
9	0 (60)	0 (40)	0 (60)	0 (2,5)	73,37	95,38
10	0 (60)	0 (40)	0 (60)	0 (2,5)	82,12	114,97
11	0 (60)	0 (40)	0 (60)	0 (2,5)	88,12	120,72

*X₁=AMM, X₂=APA, X₃=glicerol, X₄=hidrolisado de levedura (prodex). Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 25 °C, 96 h e pH inicial de 4,0.

Assim, verificou-se que o glicerol representa uma fonte de carbono adequada para a bioprodução, pois apresentou uma maior concentração de carbono, macronutriente fundamental para a célula microbiana, e baixa concentração de substâncias de cor, consideradas interferentes no meio de bioprodução. Santos (2010) constatou que o aumento da concentração de glicerol de 10 g/L para 20 g/L, proporcionou o aumento nas taxas de formação de carotenoides por *R. glutinis*. Os dados obtidos na Tabela 6 foram tratados estatisticamente e o efeito estimado das variáveis sobre a bioprodução de carotenoides totais com resíduos agroindustriais pode ser melhor visualizado pelo Gráfico de Pareto (Figura 4). Observa-se que as variáveis AMM e Glicerol apresentaram efeito significativo positivo, considerando 95 % de confiança, indicando que ao aumentar-se os níveis dos mesmos, há uma tendência de aumento na concentração de carotenoides. Por outro lado, o extrato de levedura (Prodex®) apresentou efeito significativo negativo para a bioprodução de carotenoides tendo sido excluído do meio, já que no nível (-1) a concentração do

mesmo era nula. A água de parboilização de arroz não apresentou efeito significativo, porém, como há um alto consumo de nitrogênio pelo micro-organismo, e a mesma é uma das principais fontes desse nutriente, a concentração de APA foi fixada em 20 g/L (menor nível).

Figura 4- Gráfico de Pareto para a bioprodução de carotenoides específicos em frascos agitados com resíduos agroindustriais em função das variáveis independentes.



Baseado nestes resultados um novo planejamento (planejamento fatorial completo 2²) foi conduzido visando otimizar e/ou maximizar a concentração de carotenoides empregando resíduos agroindustriais em frascos agitados. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento e a resposta em carotenoides específicos (µg/g) e carotenoides totais (µg/L).

Tabela 7- Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) e totais ($\mu\text{g/L}$) em frascos agitados.

Ensaio	*Variáveis Independentes		Carotenoides Específicos	Carotenoides totais
	X_1	X_2	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/L}$)
1	-1 (80)	-1 (80)	278,7	1125,94
2	1 (120)	-1 (80)	270,02	1071,98
3	-1 (80)	1 (120)	294,1	1199,93
4	1 (120)	1 (120)	267,9	1044,81
5	-1,41 (71,8)	0 (100)	270,3	1064,98
6	1,41 (128,2)	0 (100)	212,3	806,74
7	0 (100)	-1,41 (71,8)	215,3	826,76
8	0 (100)	1,41 (128,2)	209,9	791,13
9	0 (100)	0 (100)	335,07	1494,41
10	0 (100)	0 (100)	322,77	1362,09
11	0 (100)	0 (100)	310,47	1344,33

* X_1 = AMM (g/L); X_2 = Glicerol (g/L). Variáveis independentes fixas: 20 g/L de APA, pH inicial 4, 180 rpm, 25 °C, 96 h.

De acordo com a Tabela 7, é possível verificar que no Ensaio 9 (ponto central), utilizando-se concentrações de 100 g/L de glicerol e água de maceração de milho obteve-se a maior produção de carotenoides específicos (335,07 $\mu\text{g/g}$) e totais (1494,41 $\mu\text{g/L}$).

Os resultados foram tratados estatisticamente e as Tabelas A1 e A2 (Apêndice A) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, t(2) e a análise de variância – ANOVA do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , para a recuperação de carotenoides específicos. A Equação 20 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve os carotenoides específicos em função das variáveis analisadas (concentração de AMM e concentração de glicerol), dentro das faixas estudadas. Observa-se que a concentração de água de maceração de milho e concentração de glicerol mostraram uma influência significativa positiva ($p < 0,05$) sobre os carotenoides específicos. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA. O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação de

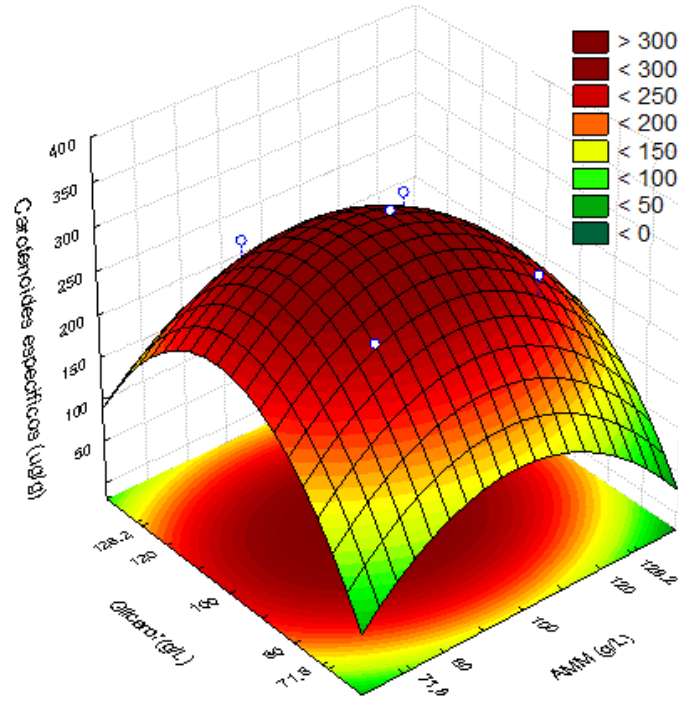
0,84 e o F calculado de 1,32 vezes maior que F tabelado, os quais permitiram a construção de superfície de resposta e de curva de contorno apresentadas na Figura 5.

$$CE = 322,64 - 56,02 X_1^2 - 84,09 X_2^2 \quad (20)$$

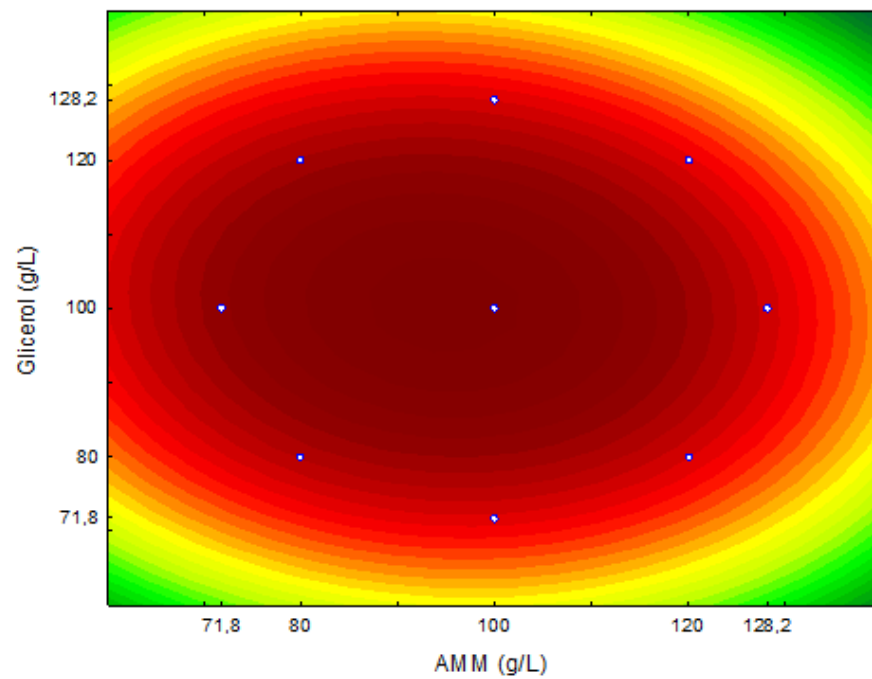
Onde:

CE = Carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$); X_1 = AMM (g/L); X_2 = Glicerol (g/L)

Figura 5- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para recuperação de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) em função da concentração de água de maceração de milho (g/L) concentração de glicerol (g/L), respectivamente.



(a)



(b)

Conforme observado na Figura 5 (a e b), há uma região de máxima produção de carotenoides na faixa próxima a 100 g/L de água de maceração de milho e glicerol, demonstrando a otimização da bioprodução de carotenoides em frascos agitados.

A Tabela 8 apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para carotenoides totais, os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do DCCR.

Tabela 8- Valores de carotenoides totais experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR.

Ensaio	CE experimental ($\mu\text{g/g}$)	CE previsto ($\mu\text{g/g}$)	Desvio	Desvio relativo (%)
1	278,70	182,53	96,17	34,50
2	270,02	182,53	87,49	32,40
3	294,10	182,53	111,57	37,93
4	267,90	182,53	85,37	31,87
5	270,30	211,26	59,04	21,84
6	212,30	211,26	1,04	0,49
7	215,30	155,46	59,84	27,79
8	209,90	155,46	54,44	25,94
9	335,07	322,64	12,43	3,71
10	322,77	322,64	0,13	0,040
11	310,40	322,64	-12,17	-3,92

Pode-se observar que os desvios foram baixos na região desejada (região de interesse) em que a recuperação de carotenoides está maximizada. Nessa faixa, o desvio é inferior a 5%, conforme o adequado.

Silva et al. (2016), realizaram produção de carotenoides a partir de *X. dendrorhous* em frascos agitados (25°C e 150 rpm por 168 horas). As variáveis estudadas foram a concentração de glicerol bruto, água de parboilização de arroz, glicose, peptona, extrato de malte, extrato de levedura e pH. A máxima recuperação de carotenoides foi obtida (326,8 $\mu\text{g/g}$) no ensaio com 10 g/L de glicerol, 10 g/L de

glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte e 1 g/L de peptona em pH 6,0. Os resultados obtidos são muito similares aos encontrados no presente estudo (335,07 µg/g), onde foram utilizados apenas resíduos agroindustriais com um tempo de produção mais baixo (96 h), levando em consideração que o mesmo micro-organismo foi utilizado na bioprodução

Em estudo semelhante, porém com outra cepa de levedura Cardoso et al. (2016) destacam que a levedura *S. ruberrimus* H110 foi capaz de utilizar glicerol bruto como fonte de carbono. Concentrações mais altas e maiores produtividades foram obtidas com o uso de glicerol obtido da produção de biodiesel em relação ao glicerol puro. Além disso, a produção de torularrodina, principal carotenoide produzido por *S. ruberrimus*, aumentou 69% contra 59% quando utilizado glicerol puro.

Juszczyk et al. (2013) demonstraram uma potencial aplicabilidade do resíduo de glicerol gerado durante a produção de biodiesel. Foram selecionadas 8 cepas de *Yarrowia lipolytica* para produção em biorreator. Foram obtidos 11,7 e 12,3 g/L de biomassa e 1,30 e 1,37 g/L de produtividade, quando utilizados glicerol comercial (98% pureza) e glicerol bruto (resíduo), respectivamente, demonstrando assim, um incremento na produção de biomassa com a aplicação do resíduo.

Valduga et al. (2014), avaliaram a produção de carotenoides da levedura *S. pararoseus* utilizando resíduos agroindustriais como substratos (glicerol bruto, água de maceração de milho, água de parboilização de arroz). Foi utilizada técnica de delineamento experimental para otimização da bioprodução de carotenoides, onde, a máxima concentração (843 µg/L) foi obtida em meio contendo 40 g/L de glicerol, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA, nas condições de 25°C, pH inicial de 4,0 e 180 rpm.

Colet (2016) estudando a otimização da bioprodução de carotenoides de *S. salmonicolor* CBS 2636 empregando resíduos agroindustriais em frascos agitados, obteve máxima produção (2278 µg/L) de carotenoides totais quando meio composto por 80 g/L de água de maceração de milho, 80 g/L de glicerol e 20 g/L de água de parboilização de arroz foi utilizado.

Em estudo sobre a otimização de meio composto por resíduos agroindustriais na produção de carotenoides por *S. pararoseus*, Machado e Burkert (2015) obtiveram máxima produção em 168 horas de processo (779,6 µg/L) com 30 g/L de glicerol bruto (da produção de biodiesel) e 52,9 g/L de água de maceração de milho, obtendo um aumento de aproximadamente 50% na produção, quando comparado ao menor resultado de resposta.

Baseado nos resultados obtidos em frascos agitados, os ensaios em biorreator foram conduzidos com meio composto por 100 g/L de água de maceração de milho, 100 g/L de glicerol e 20 g/L de água de parboilização de arroz.

4.3 Biorreator batelada simples

A Tabela 9 apresenta os valores reais e codificados do planejamento completo 2^2 e as respostas em carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) e carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) da produção em biorreator batelada simples.

Tabela 9- Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides específicos e totais por *P. rhodozyma* Y-17268, após bioprodução em biorreator batelada simples.

<i>Ensaio</i>	<i>*Variáveis Independentes</i>		<i>Carotenoides Específicos ($\mu\text{g/g}$)</i>	<i>Carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$)</i>
	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>		
1	-1 (1)	-1 (70)	204,11	1067,44
2	1 (2)	-1 (70)	305,31	742,61
3	-1 (1)	1 (290)	488,42	2179,82
4	1 (2)	1 (290)	419,56	2045,51
5	-1,41 (0,8)	0 (180)	247,71	1295,37
6	1,41 (2,2)	0 (180)	319,42	1776,01
7	0 (1,5)	-1,41 (25)	275,3	1120,33
8	0 (1,5)	1,41 (335)	262,85	1421,96
9	0 (1,5)	0 (180)	360,09	2068,54
10	0 (1,5)	0 (180)	350,71	2173,53
11	0 (1,5)	0 (180)	355,39	2121,03

*X₁= Aeração (vvm); X₂= Agitação (rpm). Variáveis independentes fixas: T° 25°C, 96 h, pH Inicial de 4,0.

De acordo com a Tabela 9, ao utilizar 1,0 vvm e 290 rpm (Ensaio 3) houve máxima produção de carotenoides totais de 2179,82 $\mu\text{g/L}$ e específicos de 488,42 $\mu\text{g/g}$.

Os resultados foram tratados estatisticamente e as Tabelas B1 e B2 (Apêndice B) apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p, t(2) e a análise de variância – ANOVA do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , para a recuperação de carotenoides totais. A Equação 21 apresenta o modelo codificado

de segunda ordem, que descreve os carotenoides totais em função das variáveis analisadas (aeração e agitação), dentro das faixas estudadas. Observa-se que a aeração e agitação mostraram influência sobre os carotenoides totais. Os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA. O modelo foi validado pela análise de variância, onde obteve-se um coeficiente de correlação de 0,85 e o F calculado de 1,29 vezes maior que F tabelado, os quais permitiram a construção de superfície de resposta e de curva de contorno apresentadas na Figura 6.

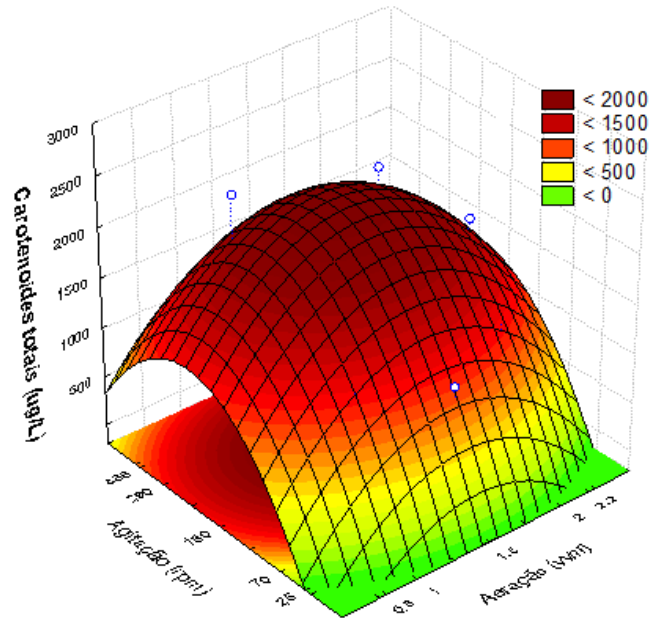
De acordo com a Figura 6, a máxima produção de carotenoides encontra-se em uma ampla faixa, na região próxima a uma agitação de 250 rpm e aeração de 1,5 vvm.

$$CT = 2120,401 - 253,93 X_1^2 + 381,20 X_2 - 387,01 X_2^2 \quad (21)$$

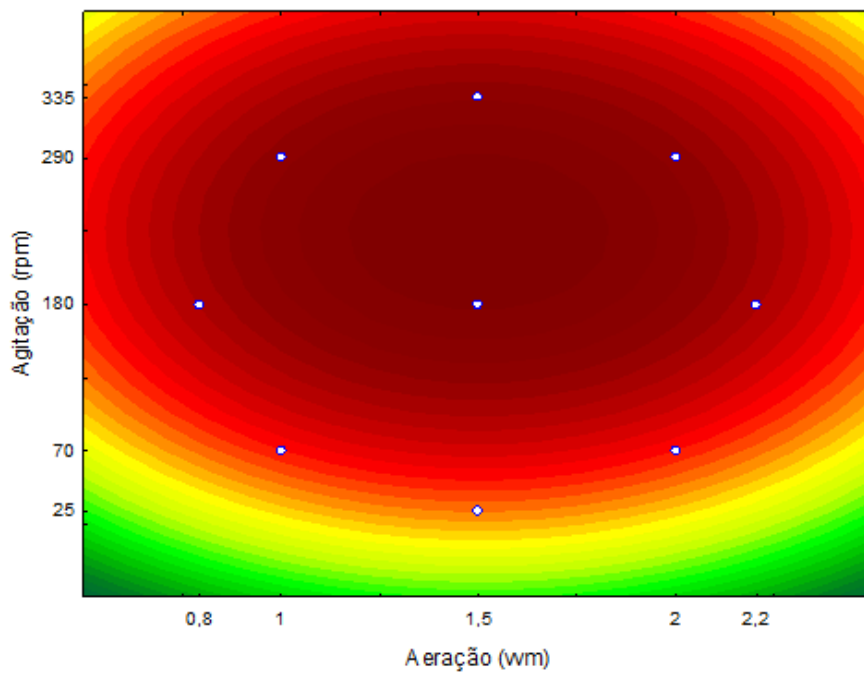
Onde:

CT = Carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$); X_1 = aeração (vvm); X_2 = Agitação (rpm)

Figura 6- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para os carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$) em função da aeração (vvm) e agitação (rpm) em biorreator batelada simples, respectivamente.



(a)



(b)

A Tabela 10 apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo para carotenoides totais, os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do DCCR.

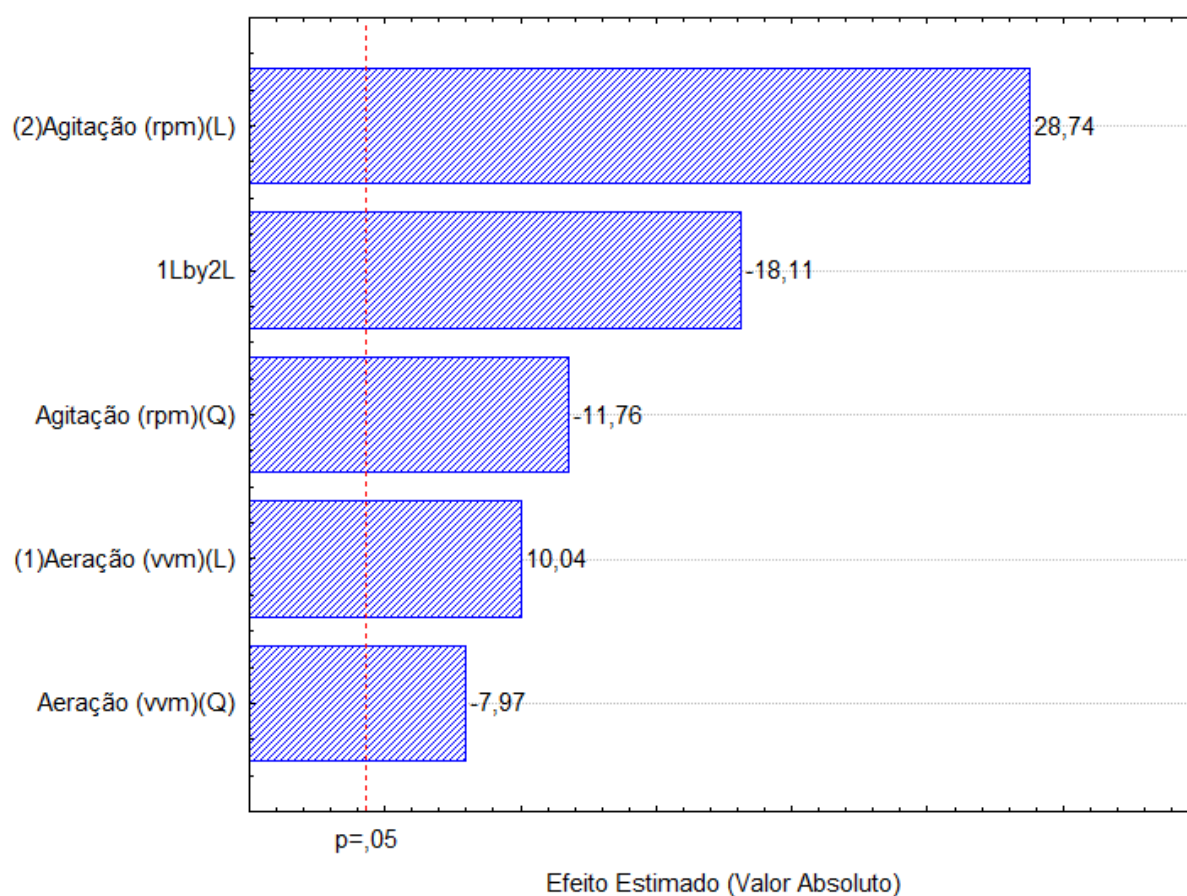
Tabela 10- Valores de carotenoides totais experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o DCCR.

Ensaio	Carotenoides totais experimental ($\mu\text{g/L}$)	Carotenoides totais previsto ($\mu\text{g/L}$)	Desvio	Desvio relativo (%)
1	1067,44	1089,26	-21,82	-2,04
2	742,61	1089,26	-346,65	-46,67
3	2179,82	1860,66	519,16	21,81
4	2045,51	1860,66	184,91	9,03
5	1295,37	1615,56	-320,19	-24,71
6	1776,01	1615,56	160,45	9,03
7	1120,33	813,49	306,84	27,38
8	1421,96	1888,47	-466,51	-32,80
9	2068,54	2120,40	-51,86	-2,51
10	2173,53	2120,40	53,13	2,45
11	2121,03	2120,40	0,63	0,029

Pode-se observar que os desvios foram baixos na região desejada em que a recuperação de carotenoides está maximizada. O resultado previsto pelo modelo é 2120,4 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 10) e o experimental foi 2200,3 $\mu\text{g/L}$, ou seja o desvio relativo foi 4%, o que é considerado positivo.

Para a produção de carotenoides específicos verifica-se máxima produção quando empregada uma agitação de 290 rpm e aeração de 1,0 vvm. A Figura 7 apresenta o Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas, onde verifica-se que a agitação e aeração apresentaram efeito linear significativo ($p < 0,05$) positivo.

Figura 7- Gráfico de Pareto para a bioprodução de carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) em biorreator em batelada simples em função das variáveis independentes.



De acordo com os resultados obtidos para os carotenoides totais, a maior produção ocorreu na faixa de aeração e agitação de 1,5 vvm e 250 rpm, respectivamente, tendo sido utilizada para execução de experimentos subsequentes. Comparando-se os resultados obtidos em frascos agitados (335,07 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos) com os alcançados em biorreator batelada simples (488,42 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos), verifica-se um incremento de 45% na bioprodução, o que demonstra que o controle de agitação e aeração foram eficazes, visto que, o meio utilizado na bioprodução em ambos os casos foi o mesmo.

Mantzouridou et al. (2002) estudaram o efeito da taxa de aeração e velocidade de agitação na produção de β -caroteno e na morfologia de *Blakeslea trispora* em biorreator de tanque agitado. Tanto a agitação quanto a aeração afetaram significativamente a concentração de β -caroteno, a produtividade, a biomassa e o coeficiente volumétrico de transferência de massa. A maior concentração de β -

caroteno ($1,5 \text{ kg/m}^3$) e a maior produtividade ($0,08 \text{ kg/m}^3$ por dia) foram obtidas com uma agitação de 150 rpm e aeração de 1,5 vvm. Além disso, a máxima produtividade ($0,08 \text{ kg/m}^3$ por dia) e biomassa em peso seco ($26,4 \text{ kg/m}^3$) foram obtidas com uma alta velocidade de agitação (500 rpm) e taxa de aeração moderada (1,0 vvm). Por outro lado, o maior coeficiente volumétrico de transferência de massa ($0,33 \text{ s}^{-1}$) foi obtido com alta agitação (500 rpm) e alta taxa de aeração (1,5 vvm).

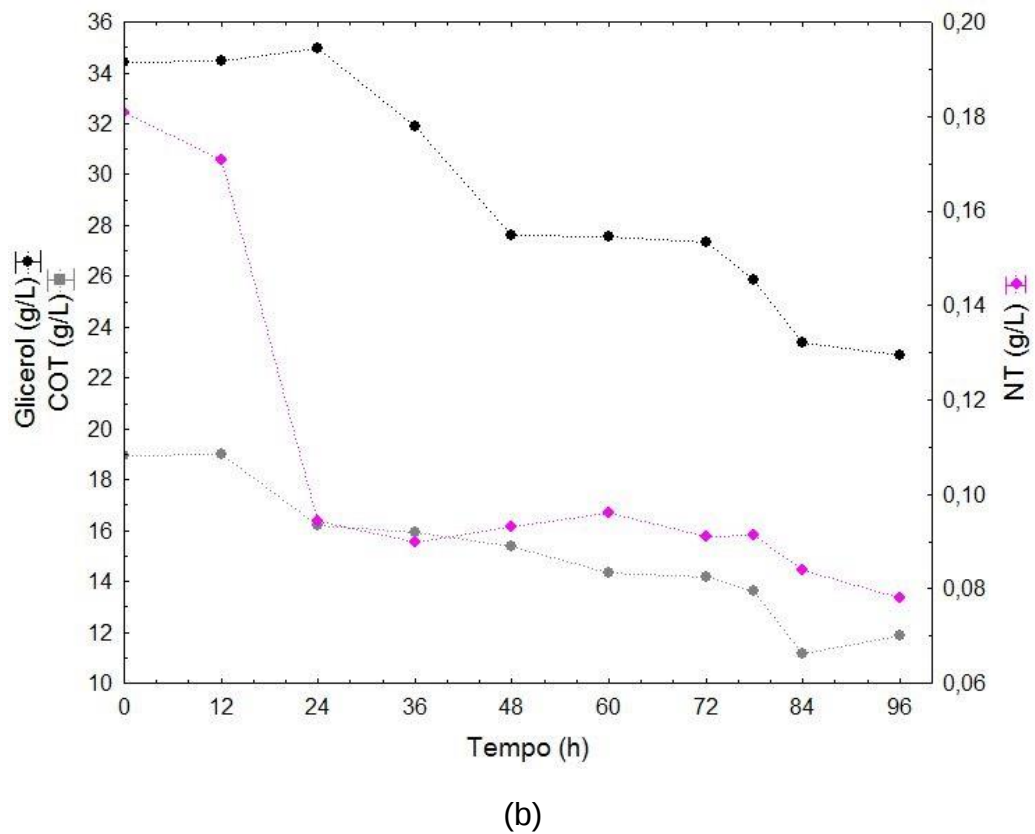
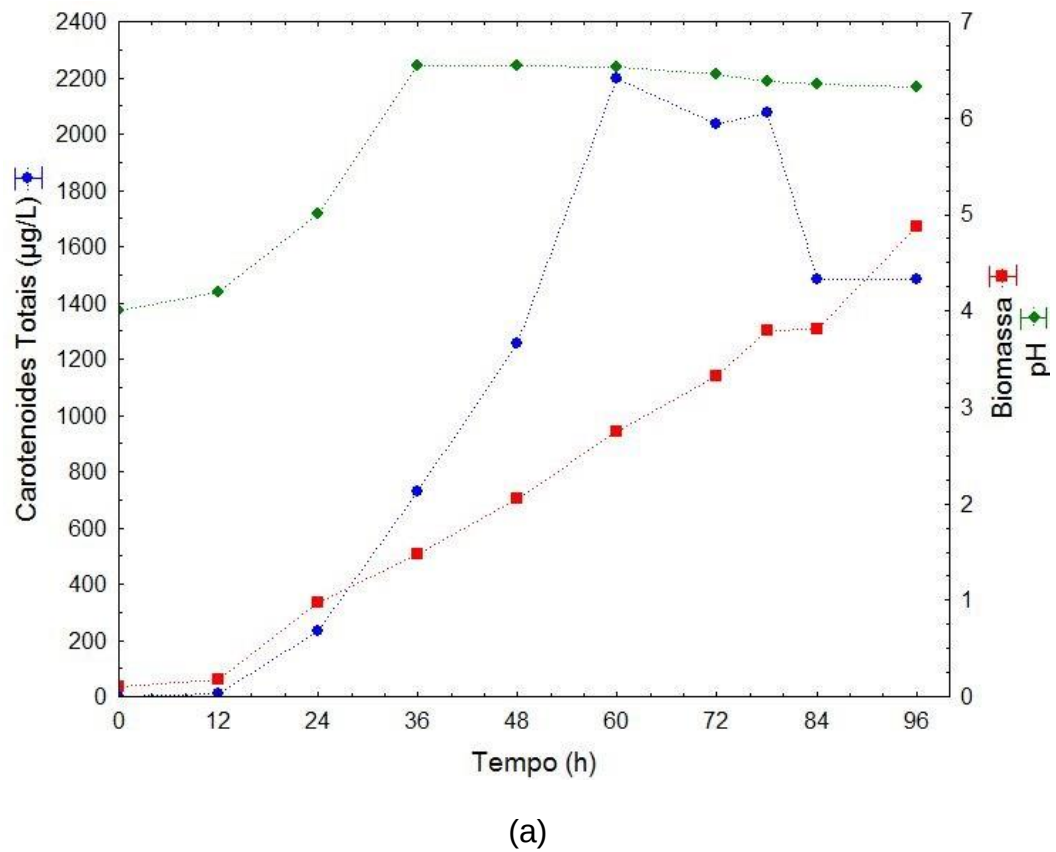
4.3.1 Estudo cinético da bioprodução de carotenoides em biorreator batelada simples

A Figura 8 (Tabela C1 no Apêndice C), apresenta as cinéticas de crescimento celular (biomassa), da bioprodução de carotenoides totais, a evolução do pH e consumo dos substratos dos ensaios realizados em batelada em biorreator com o meio otimizado com resíduos agroindustriais (100 g/L de AMM, 100 g/L de glicerol e 20 g/L de APA). Segundo análise da Figura 8, a concentração máxima de carotenoides totais foi de $2200,29 \text{ } \mu\text{g/L}$ obtida em aproximadamente 60 h do início da bioprodução. Com relação a produção de biomassa, a mesma apresentou-se crescente durante praticamente todo o processo (96 h), assim como o consumo de substrato. A diminuição na produção de carotenoides totais após 60 h, mesmo com aumento da biomassa até o fim do processo pode estar relacionada à formação de compostos secundários, como por exemplo a β -ionona que é formada pela oxidação dos carotenoides (VALDUGA, 2008).

Quando comparado aos frascos agitados ($335,07 \text{ } \mu\text{g/g}$), a produção de carotenoides específicos em biorreator batelada simples ($638,79 \text{ } \mu\text{g/g}$) incrementou aproximadamente em 48%.

Silva et al. (2016) em estudo similar, utilizando resíduos agroindustriais (glicerol bruto e AMM) na produção de carotenoides de *P. rhodozyma* em frascos agitados durante 168 h obteve máxima concentração de carotenoides específicos de $326,8 \text{ } \mu\text{g/g}$. Quando comparam-se esses resultados aos obtidos no presente estudo em biorreator batelada simples, verifica-se que a produção teve um incremento de aproximadamente 50%.

Figura 8- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de matérias primas: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em biorreator batelada simples.



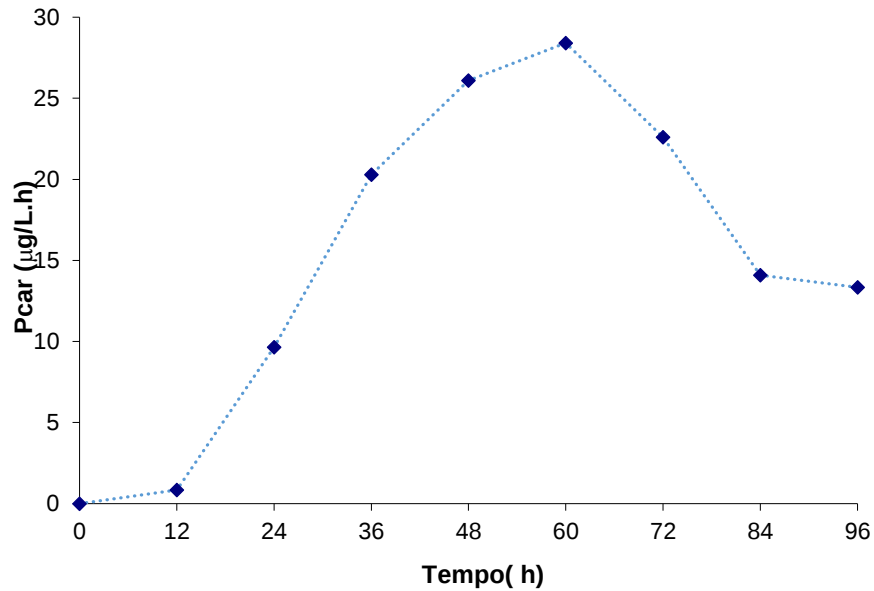
Houve maior consumo de nitrogênio total (56,83%) em relação aos outros nutrientes (COT- 37,53% e glicerol- 33,47%). Ao final da bioprodução ainda haviam elevadas concentrações de carbono orgânico total e glicerol, aproximadamente 62 e 66%, respectivamente, indicando que não ocorreu carência de substrato no meio. O pH variou de 4,0 até o máximo de 6,55, mantendo-se praticamente estável depois de 36 h de processo.

Em estudo em biorreator batelada simples, Tatsch (2008) ao produzir carotenoides de *S. salmonicolor* em biorreator obteve concentração máxima de 3426 µg/L, em tempo de bioprodução de 90 h. O consumo de nitrogênio foi de 7% e o de glicose de 53%. Além disso, o pH apresentou pequena variação (4,13 a 3,61).

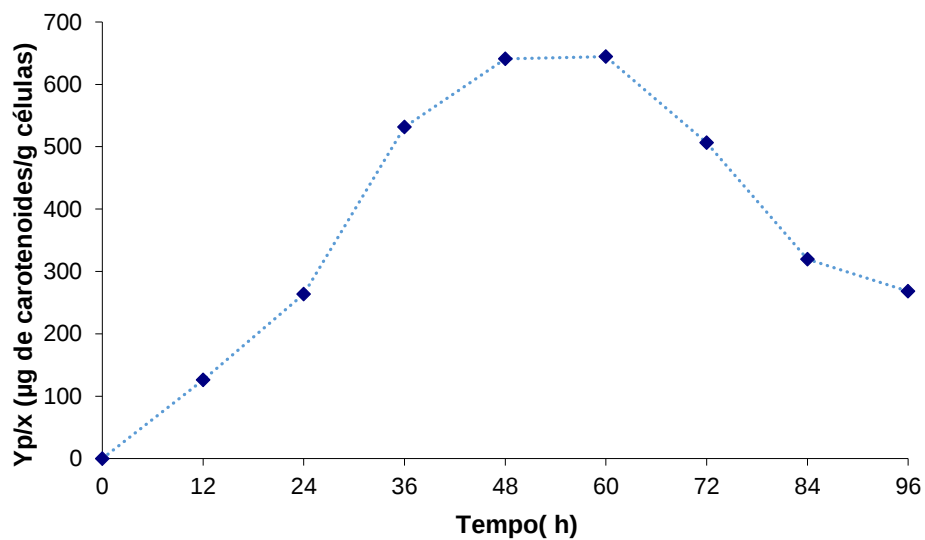
4.3.2 Parâmetros Estequiométricos

A Figura 9 (a) apresenta a produtividade em carotenoides do ensaio otimizado em biorreator batelada simples e a Figura 9 (b) apresenta fator de conversão de células em carotenoides. Observa-se que a máxima produtividade de carotenoides foi de 28,42 µg/Lh e o fator de conversão de células em carotenoides foi de 644,5 µg/g e ocorrem em 60 h de processo, respectivamente, o que pode ser visualizado e correlacionado na Figura 8, onde em 60 h houve a maior produção de carotenoides totais bem como maiores conversões de células em produtos. Valduga et al. (2011) observaram que até 40 h ocorreu aumento da produtividade em carotenoides por *S. salmonicolor*, obtendo-se um máximo de 56,0 µg/L.h em batelada simples. Tatsch (2008) observou um aumento da produtividade até 50 h (máximo de 56,9 µg/Lh) por *S. salmonicolor*.

Figura 9 - Produtividade em carotenoides global (P_{car}) (a) e fator de conversão de células em carotenoides ($Y_{p/x}$) (b) em biorreator batelada simples (96 h, 1,5 vvm, 250 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0).



(a)



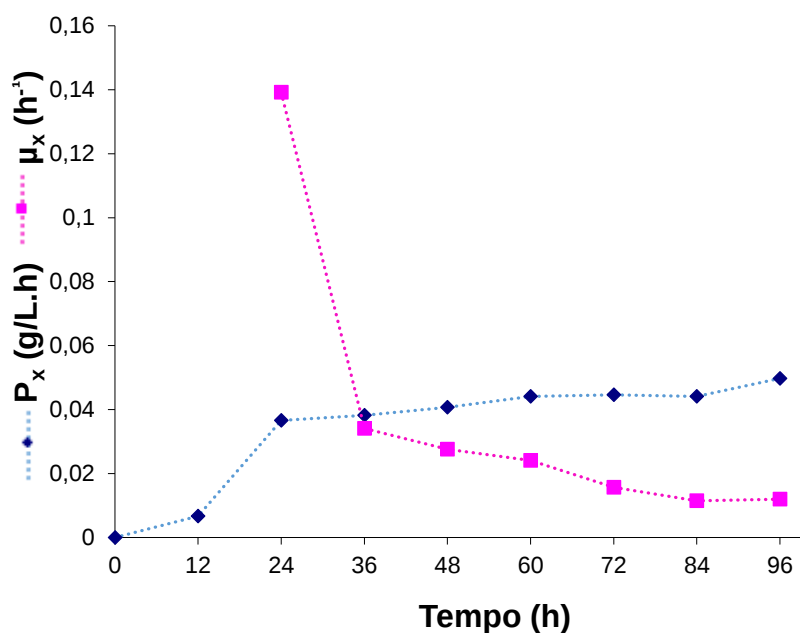
(b)

Ao comparar com trabalhos da literatura o fator de conversão em célula em carotenoides por *P. rhodozyma* foram superiores aos relatados para outros micro-organismos. Valduga et al. (2011) em produção de carotenoides de *S. salmonicolor*

em biorreator, nas condições de 1,5 vvm de aeração, 180 rpm de agitação, pH inicial de 4,0 e temperatura de 25°C obtiveram um fator máximo de 390 $\mu\text{g/g}$ em aproximadamente 60 horas de reação, utilizando meio sintético (80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte). De acordo com Liu et al. (2006), em trabalho realizado com *P. rhodozyma* quando um aumento no rendimento específico de carotenoides é observado, há uma ampliação na biossíntese de carotenoides na célula da levedura. Comportamento esse que pode estar relacionado a mudanças no metabolismo e possível estresse celular. Além disso, Luna-Flores et al. (2010) relatam que, se $Y_{p/x}$ diminui ao longo da bioprodução, há um excesso de substrato no meio e menor proporção de células para conversão em produto final (carotenoides por *X. dendrorhous*).

A Figura 10 apresenta a evolução da velocidade específica de crescimento global (μ_x) e da produtividade em célula global (P_x) durante a bioprodução em biorreator batelada simples.

Figura 10 - Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em biorreator batelada simples.



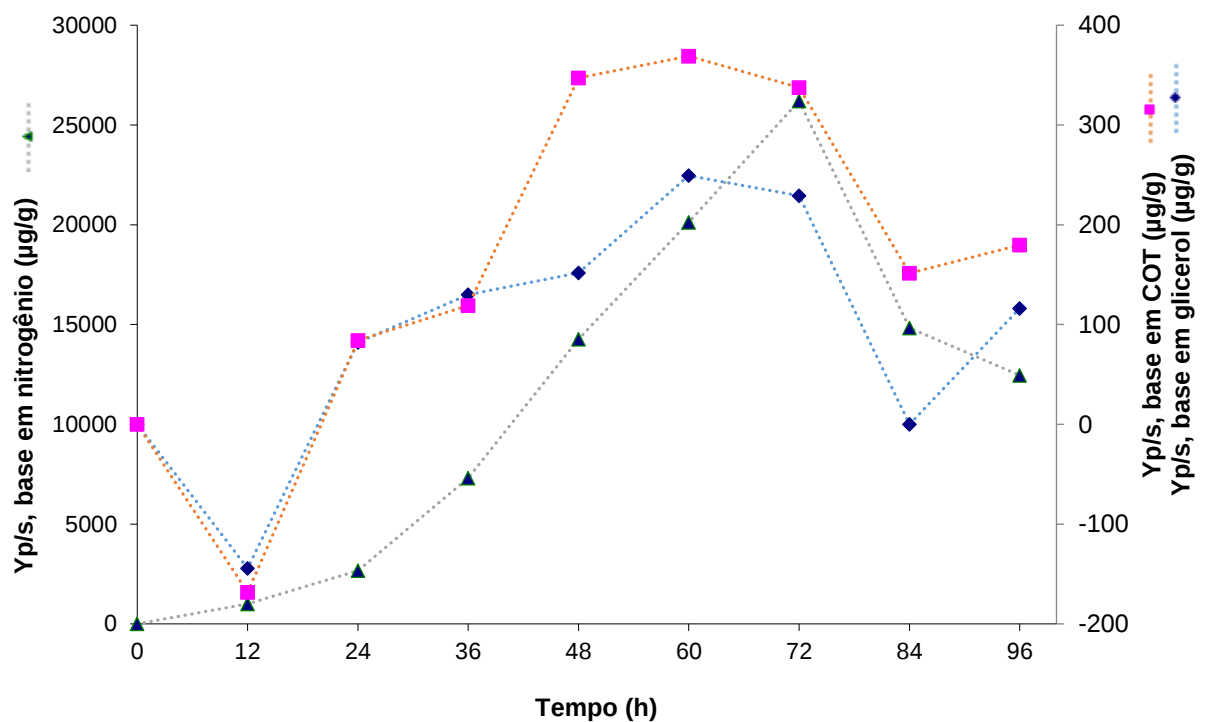
De acordo com a Figura 10, observou-se que a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}) foi de 0,139 h^{-1} com 24 h de processo. A máxima produtividade em células (P_x) foi de aproximadamente 0,049 g/L.h em 96 h. Quando há abundância

de substrato, os micro-organismos crescem com velocidade máxima ($\mu_{\max}$). Quando o substrato não se apresenta mais em abundância e não ocorre inibição por substrato, μ diminui, até atingir o valor zero quando a concentração de substrato no meio se esgota totalmente.

Valduga et al. (2011) obteve a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de $0,0456 \text{ h}^{-1}$ e a produtividade em células (P_x) máxima de $0,090 \text{ g/L.h}$, em estudo com *S. salmonicolor* em substratos sintéticos.

A Figura 11 apresenta os fatores de conversão de substratos (glicerol, carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total) em carotenoides.

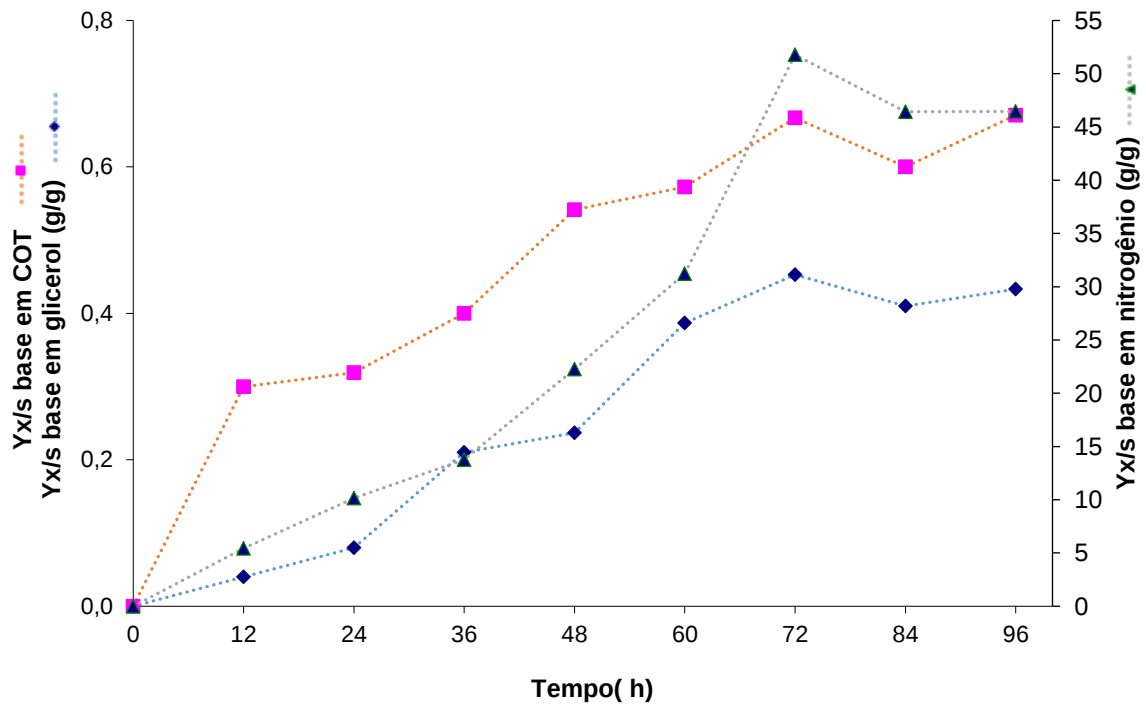
Figura 11- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides totais ao longo da bioprodução em biorreator batelada simples.



O maior fator de conversão de glicerol, COT e nitrogênio em carotenoides totais foram $249,9 \text{ µg/g}$ (60 h), 369 µg/g (60 h) e $26204,7 \text{ µg/g}$ (72 h), respectivamente. Esses resultados estão correlacionados com aqueles obtidos na Figura 8 (parâmetros cinéticos), onde no mesmo tempo (60 h) de maiores conversões de substrato em produto (carotenoides totais) houve a maior bioprodução de carotenoides.

A Figura 12 mostra a conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células.

Figura 12- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em biorreator batelada simples.



De acordo com a Figura 12, verifica-se que o maior fator de conversão foi obtido com 72 h de bioprodução utilizando 0,45 g/g glicerol, 0,67 g/g COT e 51,77 g/g nitrogênio total em células.

A Tabela 11 apresenta os maiores parâmetros cinéticos e estequiométricos globais do processo de bioprodução de carotenoides em processo de batelada pelo microorganismo *P. rhodozyma* Y-17268.

Tabela 11- Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em biorreator batelada simples em função dos tempos de bioconversão, com produção pela levedura *P. rhodozyma* Y-17268.

Parâmetros	Valor Máximo	Tempo de conversão (h)
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$ de glicerol)	249,9	60
$Y_{X/S}$ (g/g de glicerol)	0,45	72
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$ de COT)	369	60
$Y_{X/S}$ (g/g de COT)	0,67	72
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$ de nitrogênio)	26204,7	72
$Y_{X/S}$ (g/g de nitrogênio)	51,77	72
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	644,5	60
P_X (g/L.h)	0,049	96
μ_X (h^{-1})	0,139	24

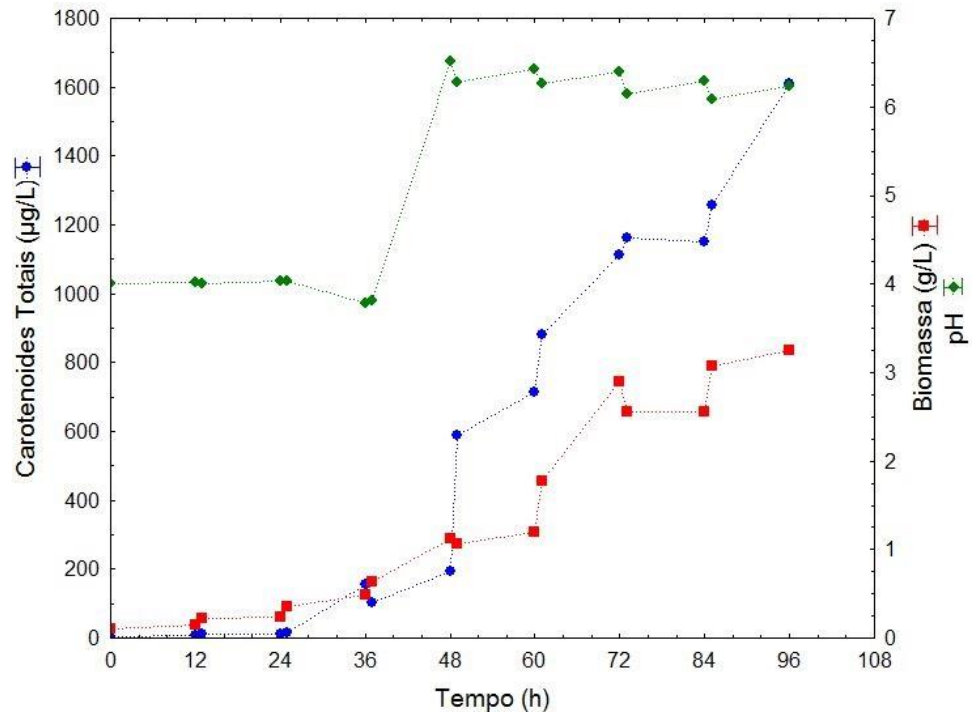
As maiores conversões de substrato (glicerol, COT e NT) ocorreram em 72 h de processo, ao mesmo tempo que ocorreu a maior produção de carotenoides específicos, onde o substrato foi assimilado.

Para os fatores de conversão $Y_{P/S}$, a maior conversão observada foi a de nitrogênio em carotenoides quando comparada às demais, o que pode ser explicado pelo maior consumo de nitrogênio (em %).

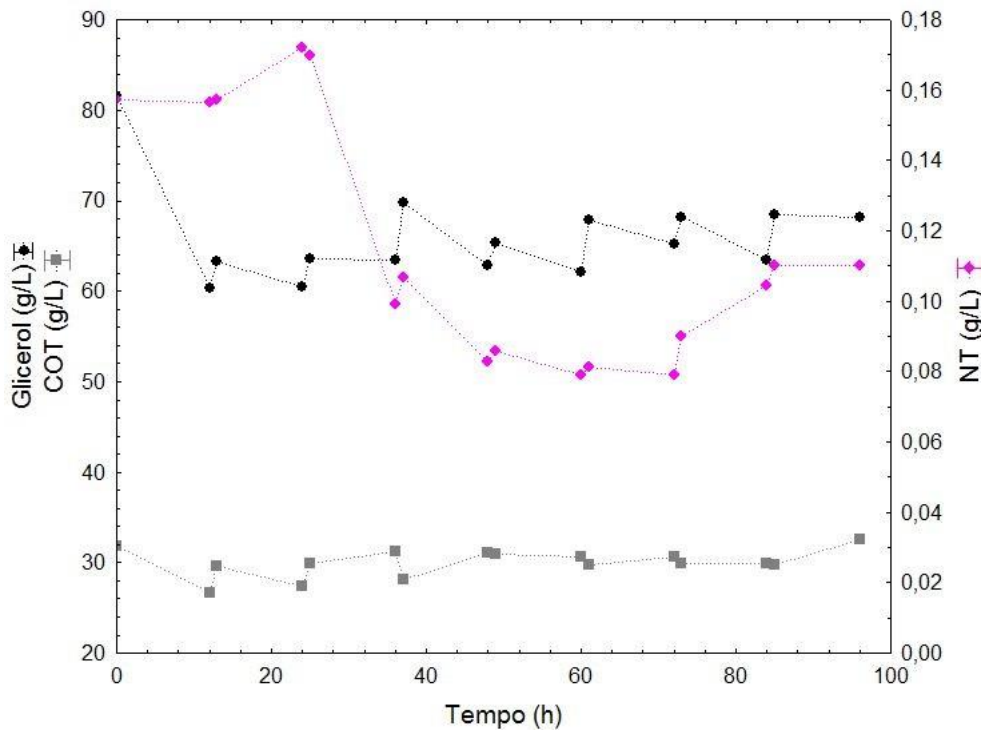
4.4 Bioprodução de carotenoides em biorreator batelada alimentada

As Figuras 13 a 16 (Tabelas C2 a C5 do Apêndice C), apresentam as cinéticas de crescimento celular (biomassa), da bioprodução de carotenoides totais e específicos, a evolução do pH e o consumo dos substratos realizados em batelada alimentada nos diferentes volumes de alimentação (50, 75, 112,5 e 150 mL) a cada 12 h.

Figura 13- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substratos: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (1) com uma taxa de alimentação de 50 mL a cada 12 h.

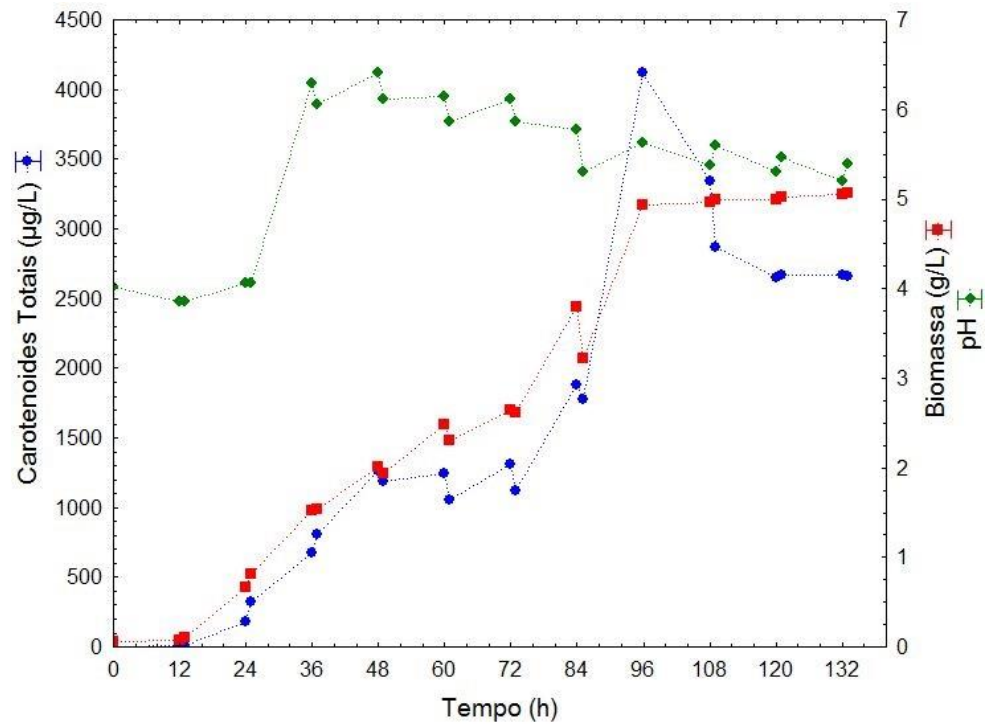


(a)

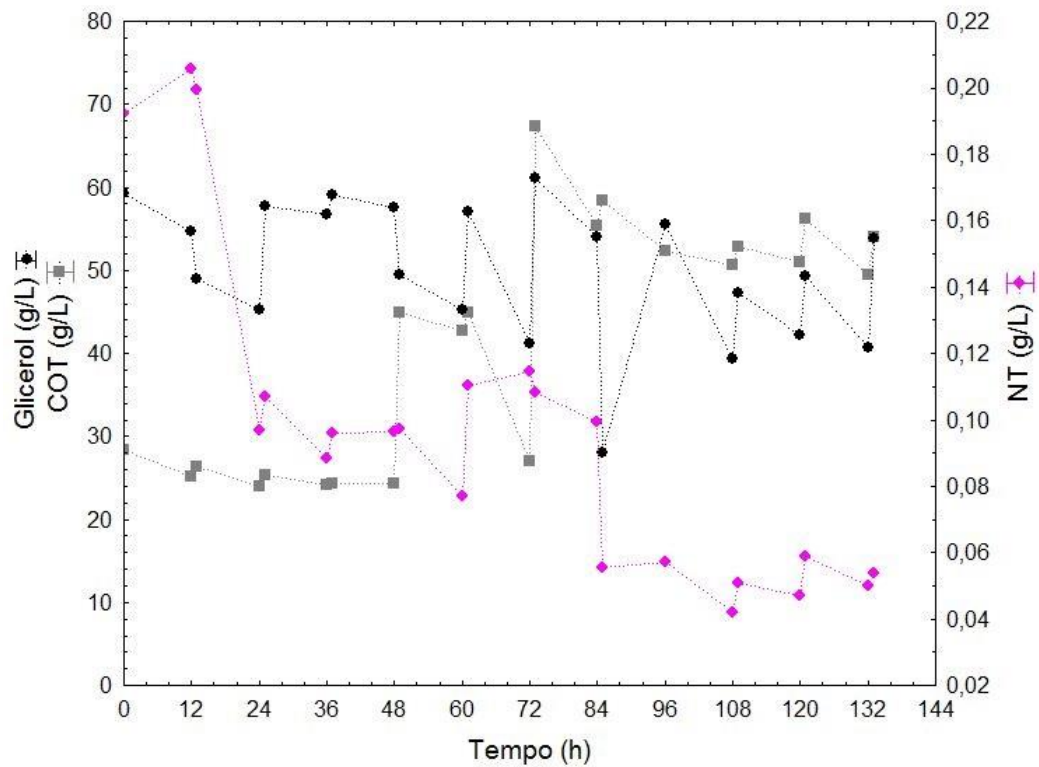


(b)

Figura 14- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substratos: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (2) com uma taxa de alimentação de 75 mL a cada 12 h.

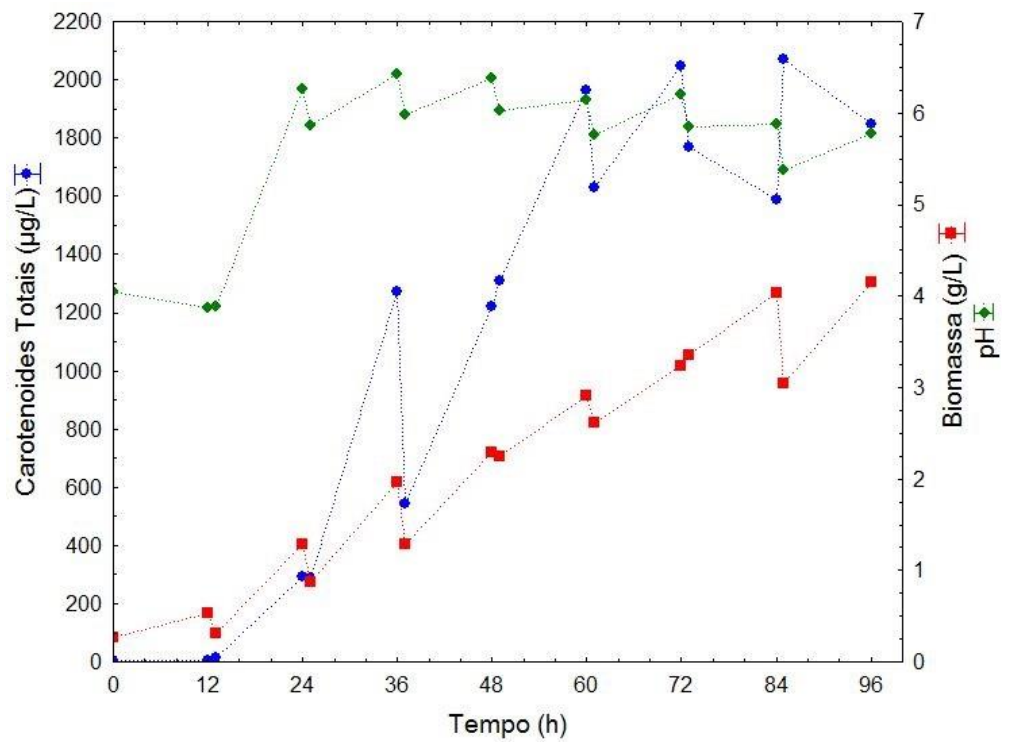


(a)

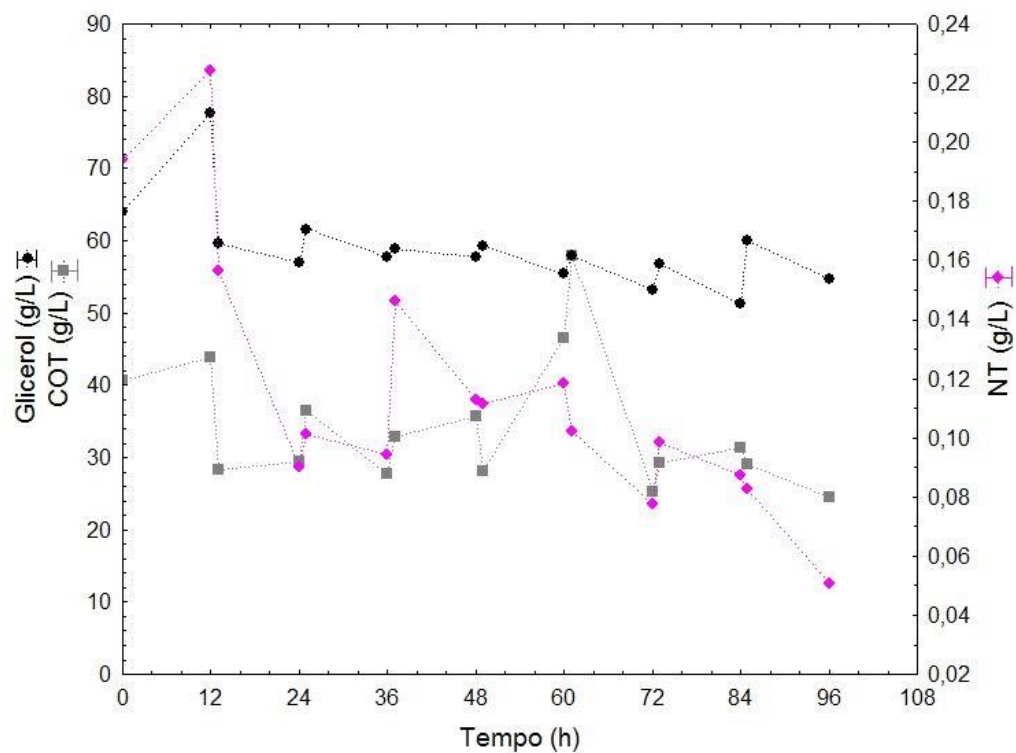


(b)

Figura 15- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substrato: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (3) com uma taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h.

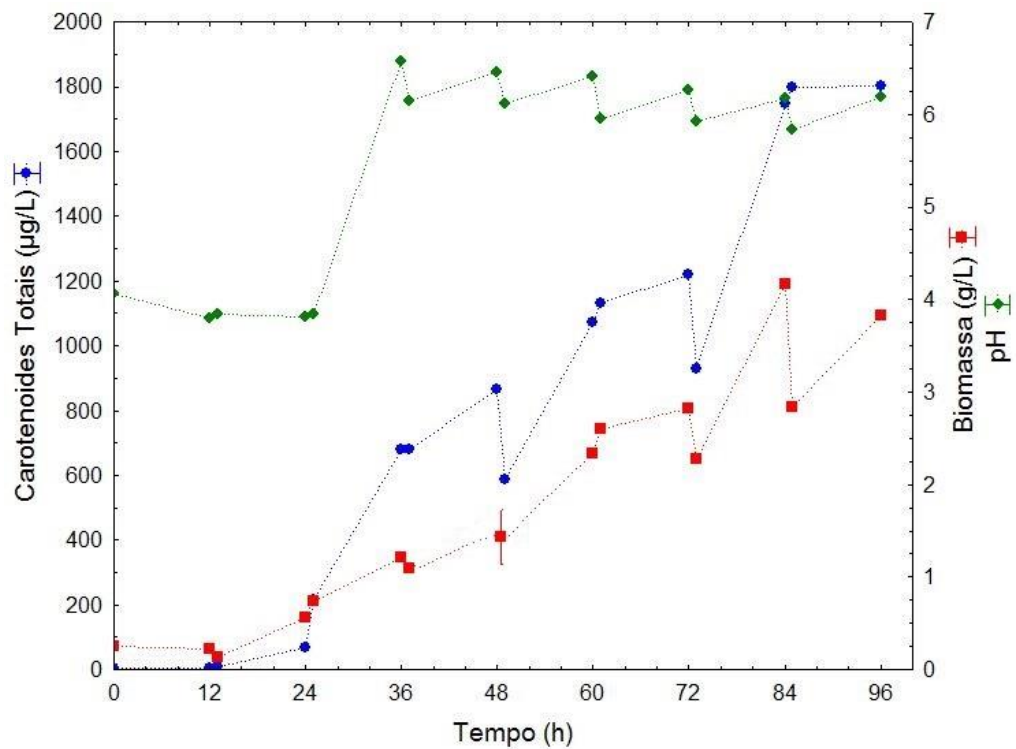


(a)

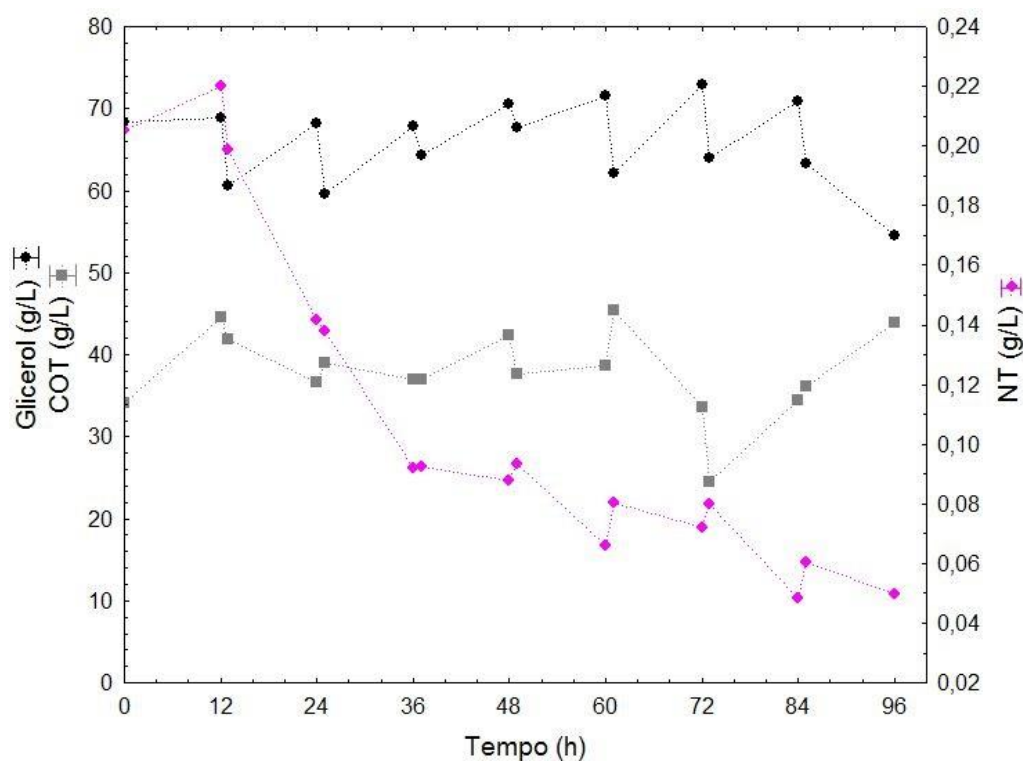


(b)

Figura 16- Cinética de produção de carotenoides totais, biomassa e pH (a), consumo de substrato: glicerol, COT e NT (b) para ensaio em batelada alimentada (4) com uma taxa de alimentação de 150 mL a cada 12 h.



(a)



(b)

A concentração máxima de carotenoides foi de 4118,18 µg/L (Ensaio 2- Figura 14a) em 96 h de bioprodução, com uma alimentação de 75 mL a cada 12 h. No entanto com a alimentação de 150 mL a cada 12 h, e em 96 h de bioprodução houve a maior concentração de carotenoides (1807,42 µg/L). Porém cerca de 2,4 vezes inferior ao anterior, o que demonstra que a utilização de maior volume de alimentação não levou a um aumento na produção de carotenoides. Esse fato pode estar presença de inibidores no meio, onde o excesso de nutrientes adicionados acarretou no estacionamento da bioprodução, comprovado pela alta quantidade de COT residual, que pode estar relacionado à rota metabólica do micro-organismo.

Ao correlacionar a produção em batelada alimentada (máxima concentração de carotenoides totais) com a obtida na otimização em batelada simples (2200,29 µg/L- Figura 8a) verifica-se que houve um incremento de aproximadamente 87%, demonstrando que a adição controlada de nutrientes e consequente assimilação de substrato, resultou em maior produção de biomassa e carotenoides totais.

Resultados similares foram obtido em trabalhos do grupo. Colet et al. (2015) em estudo da produção de carotenoides a partir de *S. salmonicolor* em batelada alimentada, utilizando como substrato resíduos agroindustriais (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA), obtiveram máxima produção de 4400 µg/L em 96 h de processo, com uma taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h.

Um dos parâmetros que influenciam o crescimento celular e a formação de produto é o pH, o que torna a sua evolução em objeto de estudo na produção de carotenoides. Observando-se as Figuras 13 a 16 verifica-se comportamento semelhante, independente do volume de alimentação de meio, no qual o pH manteve-se constante durante as primeiras 24 h, quando apresentou um aumento, sendo que, após esse tempo de bioprodução, pequenas variações foram observadas. A carotenogênese e o crescimento celular acompanharam a elevação do pH (4,0 a 6,5), sendo que a máxima produção de carotenoides (4118,18 µg/L) foi verificada em pH 5,63.

Em estudo similar, Colet et al. (2015) da mesma forma verificaram que há um aumento no pH independentemente do volume de meio a ser alimentado. Observaram um aumento de até 7,68 nas primeiras 24 h de bioprodução, ocorrendo após esse período um decréscimo progressivo até valores próximos de 4,0, no fim do processo.

Em estudo para aumento da produção de lipídios e carotenoides de *Rhodospiridium toruloides* com a utilização de batelada alimentada, Dias et al. (2015)

analisaram o controle do pH, e verificaram que quando a fase de crescimento da levedura foi conduzida em pH 4,0 e a fase de acúmulo de produto em pH 5,0, a produtividade de biomassa, de ácidos graxos totais e de carotenoides foi significativamente maior quando comparada com a produção em batelada simples com pH fixo (4,0 ou 5,0).

A bioprodução de carotenoides por *P. rhodozyma* apresenta formação de carotenoides parcialmente associada ao crescimento celular. No Ensaio 2 (Figura 14), com volume de alimentação de 75 mL a cada 12 h foi verificada a maior concentração de células (4,93 g/L) em 96 h de bioprodução. Esse aumento na concentração quando comparado à batelada simples (cerca de 15%), se deve ao fato de alimentar periodicamente o substrato durante o processo. Desta forma as células podem utilizar maiores fontes de carbono e nitrogênio para sua manutenção e produção, convertendo-se também, em maior produção de carotenoides totais e específicos.

A Tabela 12 apresenta o consumo de substrato nos diferentes ensaios em biorreator em batelada alimentada.

Tabela 12- Consumo de substrato (%) ao longo da bioprodução em biorreator batelada alimentada ao final de cada ensaio.

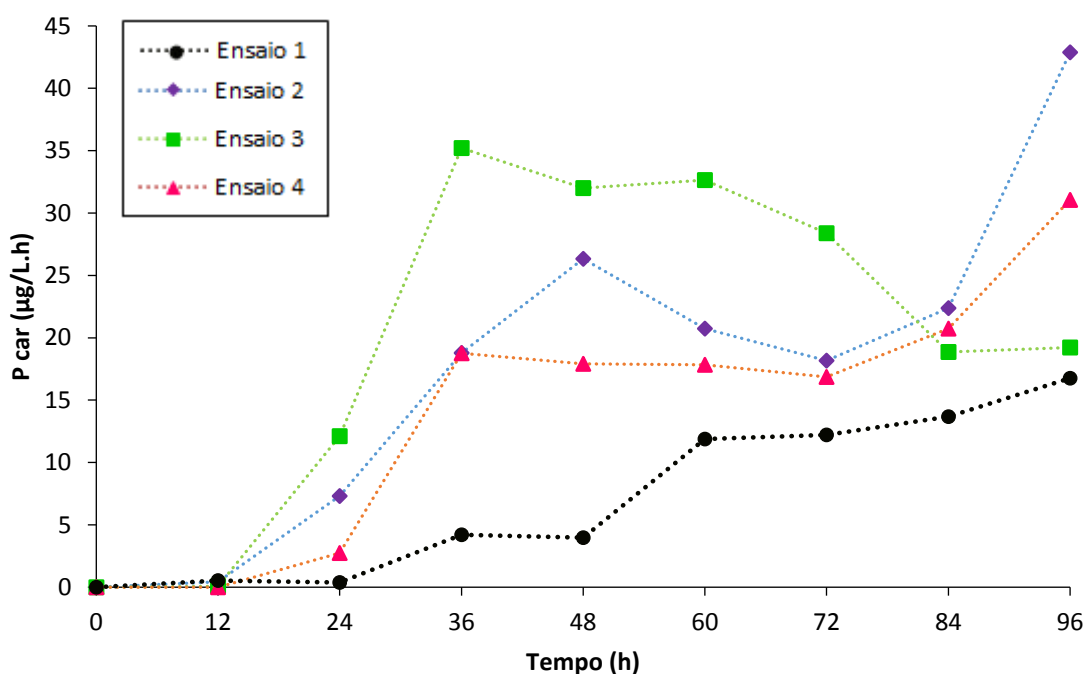
Ensaio	Consumo de substratos (%)		
	COT	NT	Glicerol
1- 50 mL	-	30,11±0,25	16,43±0,5
2- 75 mL	-	71,91±0,7	9,11±0,38
3-112,5 mL	44,12±0,75	53,44±0,21	14,34±1,23
4-150 mL	-	61,79±0,69	20,39±0,2

Em todos os ensaios houve maior consumo de NT em relação aos outros nutrientes. Nos Ensaios 1, 2 e 4 a concentração final de carbono orgânico total foi superior a inicial, devido à alimentação de nutrientes durante o processo, causando assim, um acúmulo de substrato no meio.

4.4.1 Parâmetros Estequiométricos

A Figura 17 apresenta a produtividade em carotenoides do sistema batelada alimentada para os ensaios com volume de meio alimentado de 50 mL (Ensaio 1), 75 mL (Ensaio 2), 112,5 mL (Ensaio 3) e 150 mL (Ensaio 4).

Figura 17- Produtividade em carotenoides global (P_{car}) ao longo da produção em biorreator batelada alimentada nos Ensaios 1 (50 mL), 2 (75 mL), 3 (112,5 mL), e 4 (150 mL).



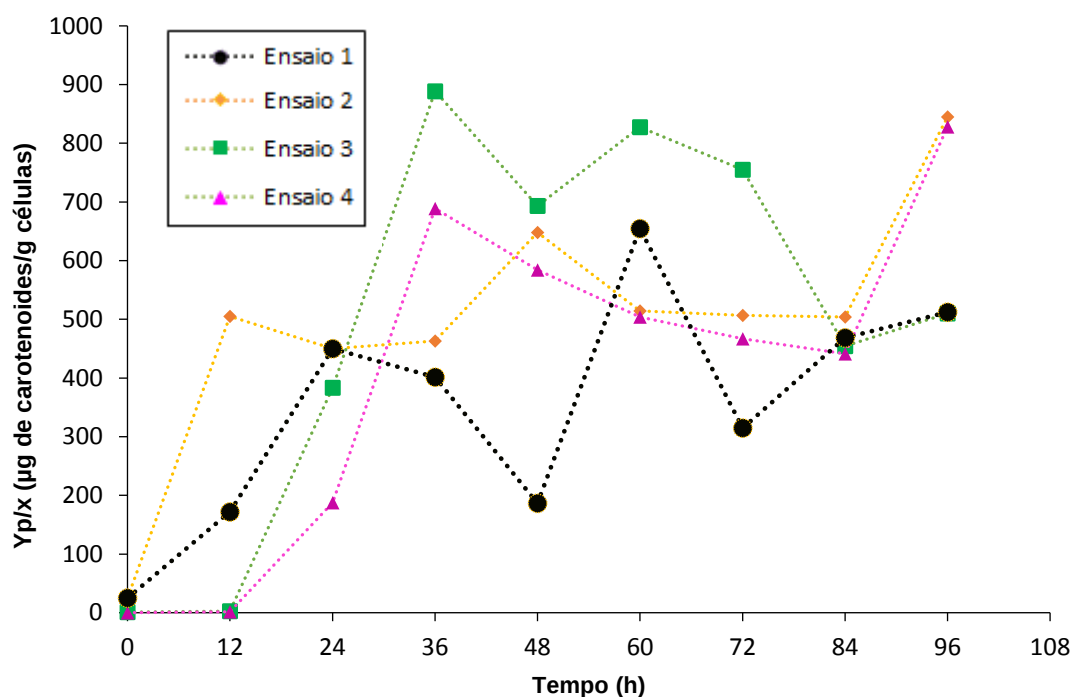
De acordo com a Figura 17 no Ensaio 2 foi verificada a máxima produtividade de 42,87 $\mu\text{g/L.h}$ em 96 h. No entanto, no Ensaio 3 verifica-se uma maior região de alta produtividade (36 até 72 h) obtendo-se a máxima produtividade (35,20 $\mu\text{g/L.h}$) com 36 h de produção. Após esse tempo houve uma variação, sendo que após 60 h a produtividade decresceu constantemente, obtendo-se um mínimo de 18,8 $\mu\text{g/L.h}$. Já no Ensaio 4, a produtividade aumentou até 36 h, mantendo-se praticamente constante até 84 h de processo, quando apresentou um pequeno incremento, atingindo seu máximo (31,05 $\mu\text{g/L.h}$) em 96 h de bioprodução. O Ensaio 1 apresentou a menor produtividade (16,75 $\mu\text{g/L.h}$) em 96 h de processo.

Quando comparada a produtividade em 60 horas, dos Ensaios 2 e 3, o Ensaio 3 apresenta um melhor resultado, o que pode ser explicado pela produção de carotenoides específicos (Figura 18) que também é superior no Ensaio 3 com um tempo de reação de 36 h, ao contrário da produção de carotenoides totais que foi superior em 72 h de produção do Ensaio 2.

Colet et al. (2015), utilizando a levedura *S. salmonicolor* em bioprodução em batelada alimentada, obteve maior produtividade (45 $\mu\text{g/L.h}$) em 96 h de bioprodução, com um volume de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h.

A Figura 18 mostra a relação entre a produção de carotenoides e a produção de células dos ensaios realizados ao longo da bioprodução.

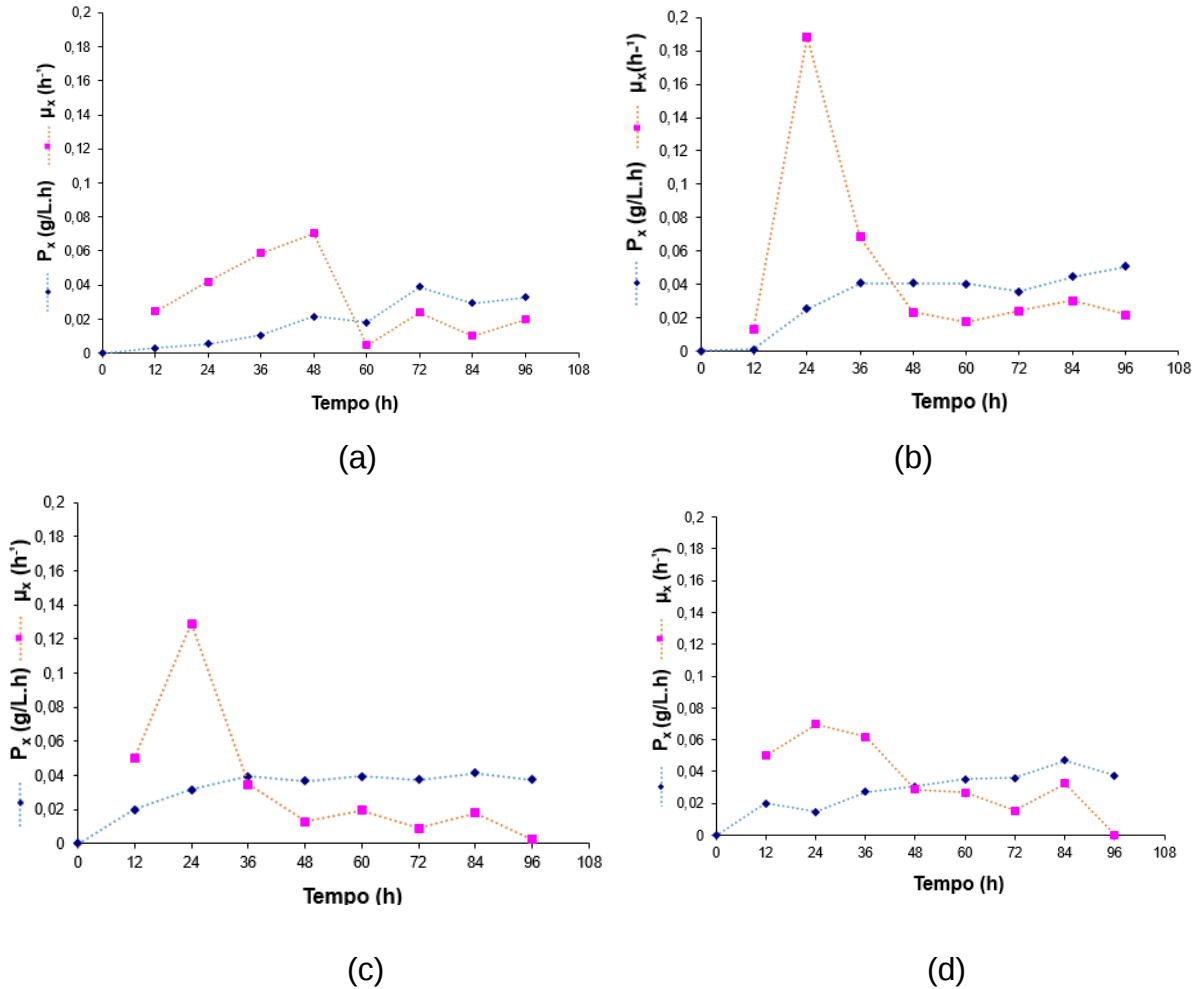
Figura 18- Relação entre a produção de carotenoides e a produção de células ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos Ensaios 1 (50 mL), 2 (75 mL), 3 (112,5 mL) e no 4 (150 mL).



De acordo com a Figura 18, o fator $Y_{P/X}$ máximo foi de 888,82 $\mu\text{g/g}$ obtido no Ensaio 3 com 36 h e 828,15 $\mu\text{g/g}$ e no Ensaio 2 em 96 h de bioprodução.

A Figura 19 (a, b, c, d) 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 (Ensaios 1, 2, 3 e 4), respectivamente.

Figura 19- 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 – 50 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL), no Ensaio 3 (c – 112,5 mL) e no Ensaio 4 (d- 150 mL), respectivamente.



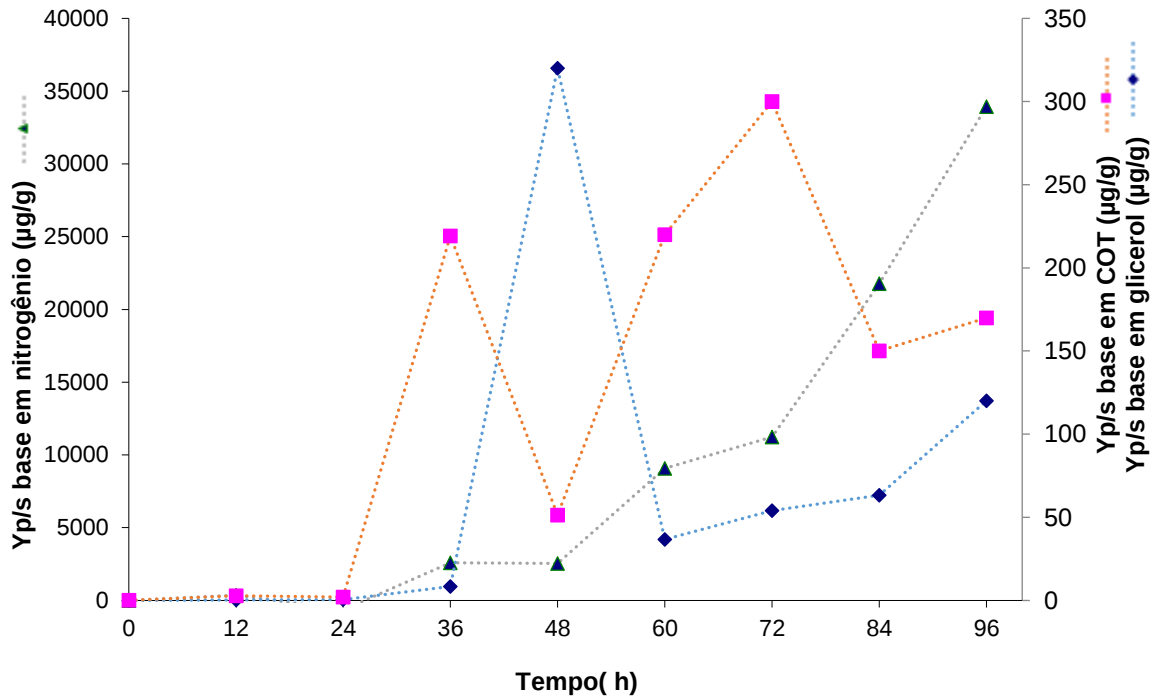
De acordo com a Figura 19b, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi 0,188 h^{-1} (alimentação de 75 mL a cada 12 h, no Ensaio 2) em 24 h e a produtividade em células (P_x) foi de 0,05 $g/L.h$ em 96 h. Na Figura 19d, quando foi realizada uma alimentação de 150 mL de substrato a cada 12 h, obteve-se μ_{max} de 0,07 h^{-1} e P_x de 0,04 $g/L.h$. Em condição de alta concentração de substrato, o micro-organismo cresce com velocidade máxima (μ_{max}), já quando o mesmo diminui, sem ocorrência de inibição de substrato, μ diminui até atingir valor zero (substrato esgotado), como é verificado na Figura 19.

Luna-Flores et al. (2010) realizando produção de carotenoides de *X. dendrorhous* em batelada alimentada obteve um $\mu_{\max}$ de $0,1258 \text{ h}^{-1}$, valor esse semelhante com o Ensaio 1 obtido no presente trabalho, e também dentro da faixa reportada por outros autores (Yuan-Shuai e Jiang-Yong, 2008).

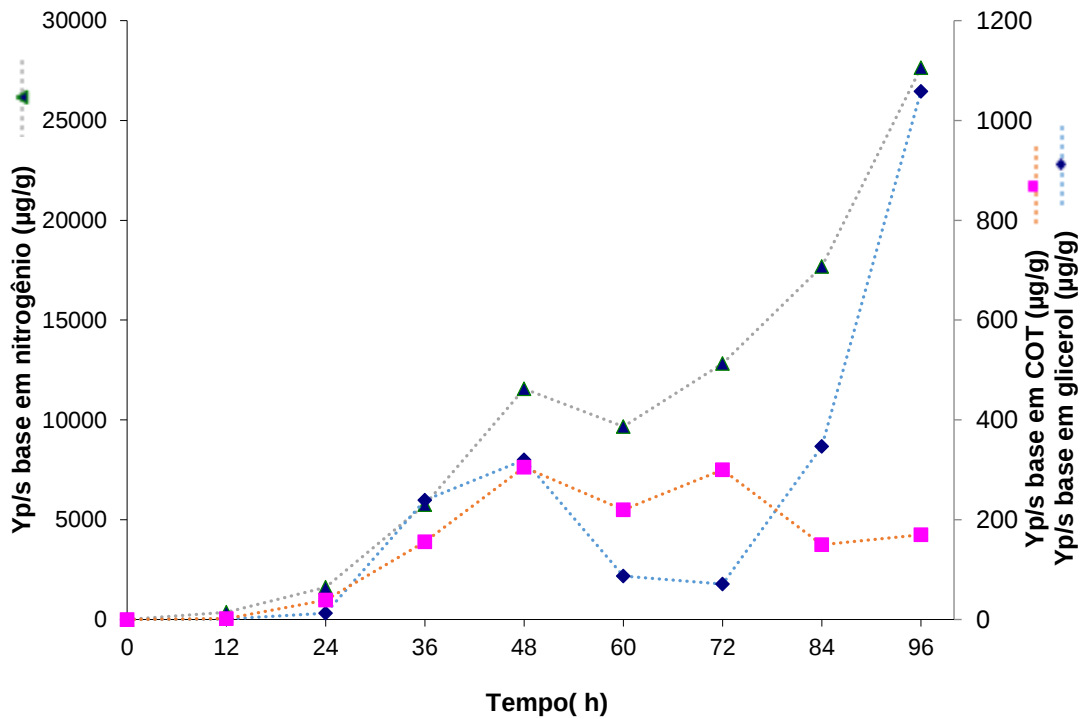
A Figura 20 (a, b, c, d) apresenta os fatores de conversão de glicerol, carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total em carotenoides (Ensaio 1, 2, 3 e 4), respectivamente.

Os maiores fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides foram de $1058,1 \mu\text{g/g}$, $394,57 \mu\text{g/g}$ e $33938 \mu\text{g/g}$ no para os Ensaio 2 (96 h), Ensaio 4 (48 h) e Ensaio 1 (96 h), respectivamente.

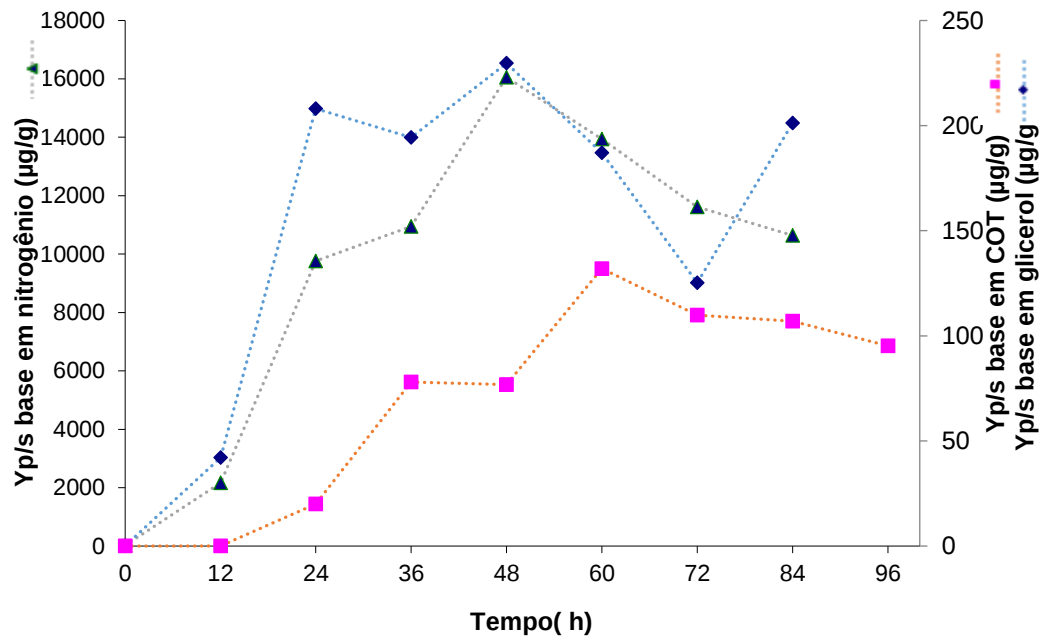
Figura 20- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 50 mL), no Ensaio 2 (b – 75 mL), no Ensaio 3 (c – 112,5 mL) e no Ensaio 4 (d- 150 mL), respectivamente.



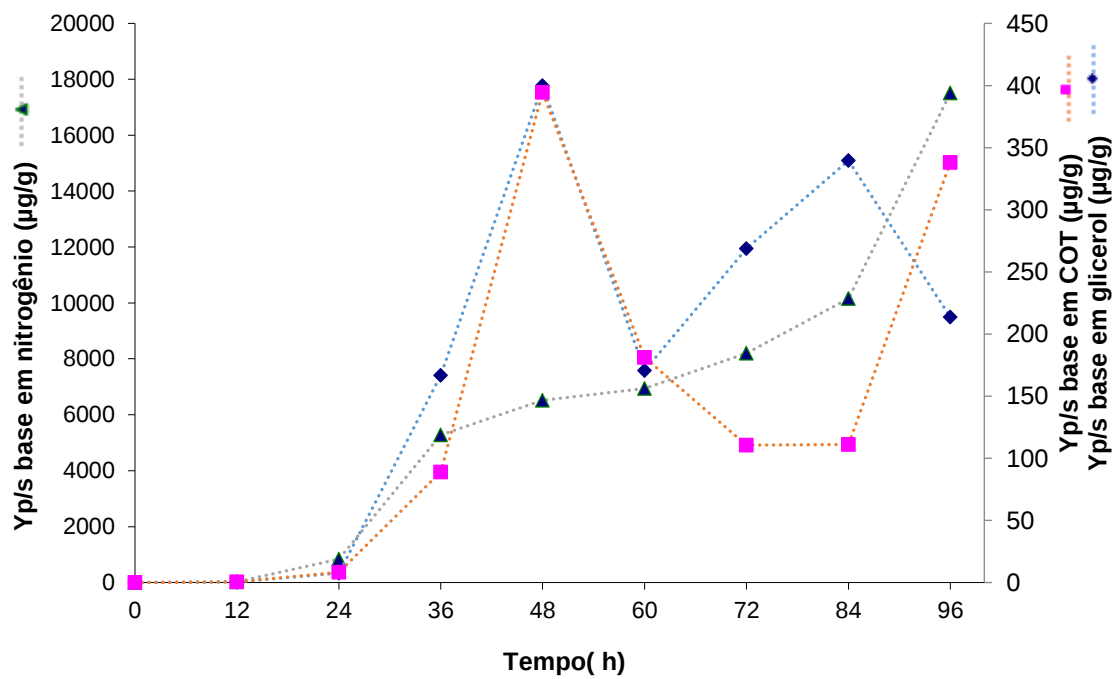
(a)



(b)



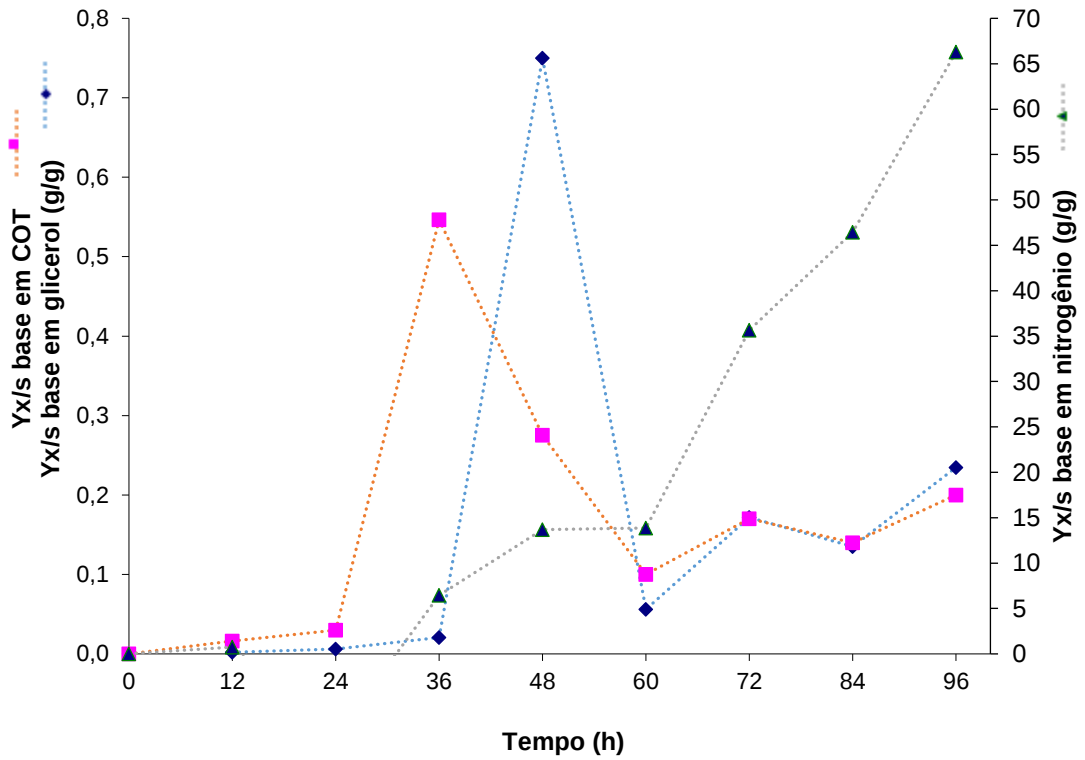
(c)



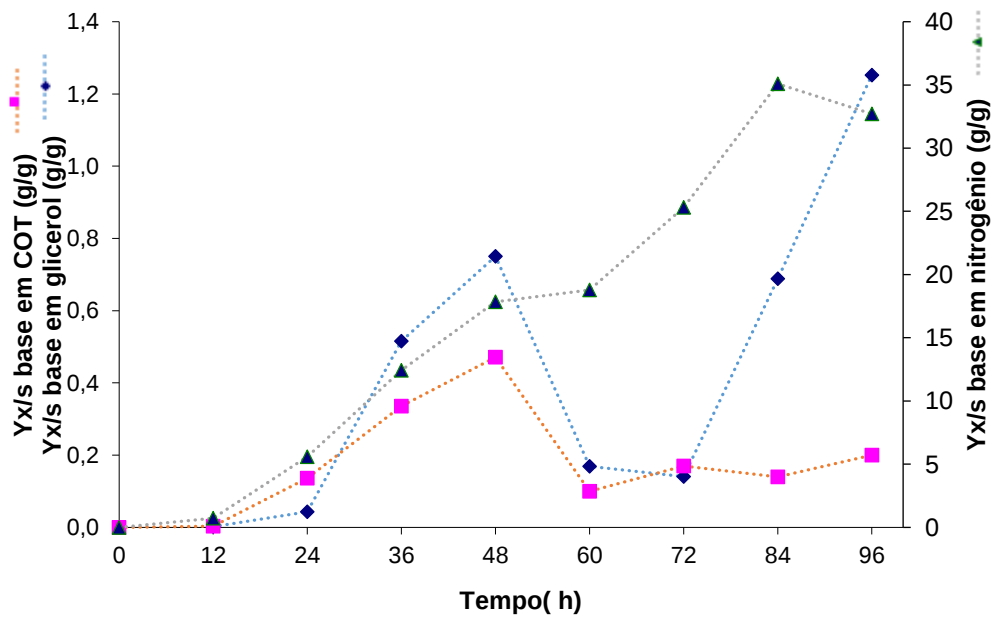
(d)

A Figuras 21 (a, b, c, d) mostram a conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células nos Ensaios 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

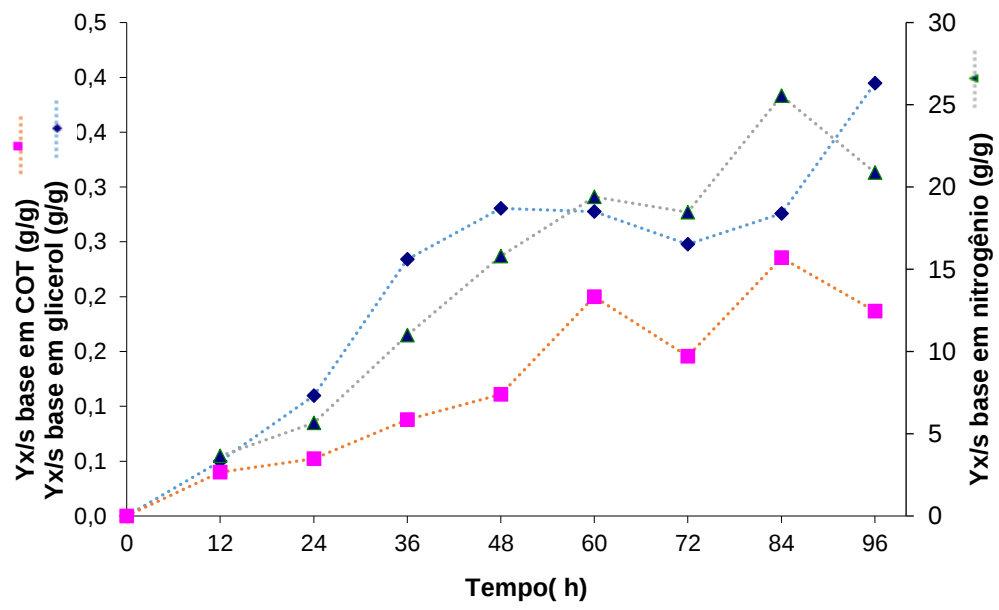
Figura 21- Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 50 mL), no Ensaio 2 (b – 75 mL), Ensaio 3 (c – 112,5 mL) e no Ensaio 4 (d- 150 mL), respectivamente.



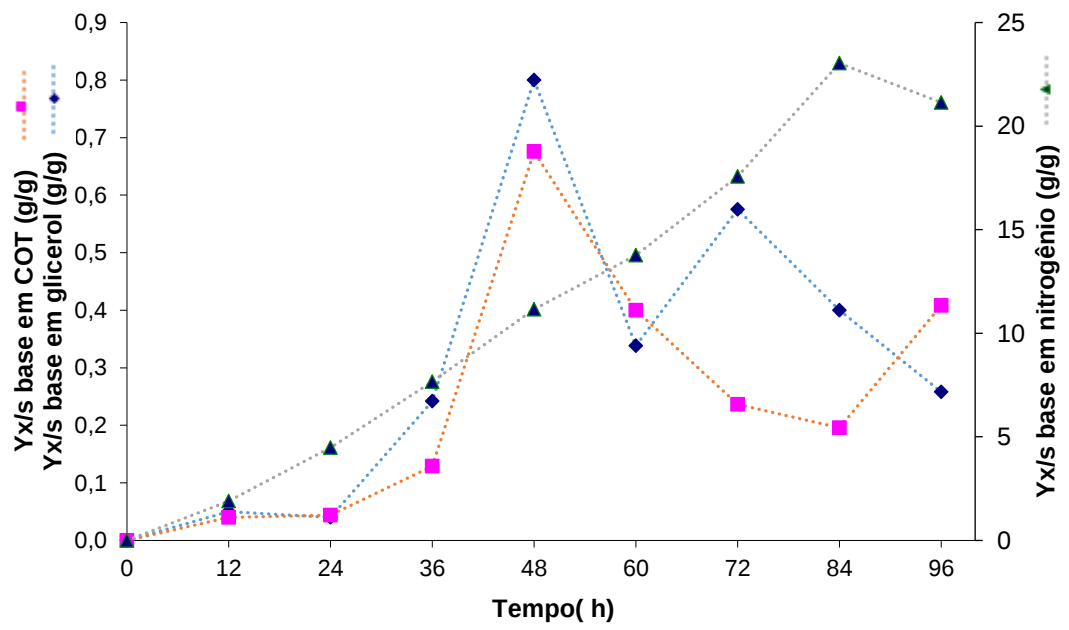
(a)



(b)



(c)



(d)

Na Figura 21 observa-se que os maiores fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células foram obtidos no Ensaio 2 (alimentação de 75 mL a cada 12 h) em 96 h de bioprodução (1,25 g/g), no Ensaio 4 com 48 h de bioprodução (0,67 g/g) e no Ensaio 1 (alimentação de 50 mL a cada 12 h) em 96 h de bioprodução (66,28 g/g), respectivamente.

Em processos fermentativos, esses fatores de conversão dificilmente serão constantes. Embora dependam do micro-organismo utilizado em relação a um determinado substrato, não dependem apenas disto, os demais componentes do meio também influenciam nessas conversões, assim como o tempo de agitação e a transferência de oxigênio no biorreator (SCHMIDELL et al., 2001).

A Tabela 13 apresenta os maiores parâmetros cinéticos e estequiométricos globais do processo de bioprodução de carotenoides em processo de batelada alimentada pelo microrganismo *P. rhodozyma* Y-17268.

Tabela 13- Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de carotenoides em batelada alimentada.

Parâmetros	Valor Máximo Obtido	Volume Alimentado (mL)	Tempo de maior conversão (h)
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$ de glicerol)	1058,1	75	96
$Y_{X/S}$ (g/g de glicerol)	1,25	75	96
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$ de COT)	394,57	150	48
$Y_{X/S}$ (g/g de COT)	0,67	150	48
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$ de nitrogênio)	33938	50	96
$Y_{X/S}$ (g/g de nitrogênio)	66,28	50	96
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	888,82	112,5	36
P_X (g/L.h)	0,05	75	96
μ_X (h^{-1})	0,188	75	24

Os fatores de conversão, quando comparados aos obtidos em batelada simples foram todos superiores, demonstrando que, a utilização da batelada alimentada foi eficaz no aumento da bioprodução.

4.5 Comparação entre os sistemas

A Tabela 14 apresenta os valores máximos de recuperação de carotenoides obtidos nos diferentes processos estudados.

Tabela 14- Máxima recuperação de carotenoides específicos e totais obtidas em diferentes sistemas.

Sistema	Carotenoides Específicos ($\mu\text{g/g}$)	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)	Tempo (h)
Frascos Agitados	335,07	1494,41	96
Biorreator Batelada	629,47	2200,29	60
Biorreator Batelada alimentada (50 mL)	494,89	1612,07	96
Biorreator Batelada alimentada (75mL)	835,34	4118,19	96
Biorreator Batelada alimentada (112,5 mL)	682,09	2070,16	84
Biorreator Batelada alimentada (150 mL)	781,52	2985,42	96

Quando se compara o processo em batelada simples ao processo em frascos agitados, têm-se um incremento de 88% em relação aos carotenoides específicos e 47% em relação aos carotenoides totais. O processo batelada alimentada (75 mL) ocasionou um aumento na bioprodução de carotenoides totais de 175 e 87% quando comparado ao processo em frascos agitados e batelada simples, respectivamente, e na bioprodução de carotenoides específicos de 149 e 32% quando comparado ao processo em frascos agitados e batelada simples, respectivamente.

4.6 Identificação e quantificação dos carotenoides

Realizou-se a identificação dos carotenoides produzidos em biorreator batelada alimentada com volume de alimentação de 75 mL a cada 12 h que apresentou maior recuperação.

A Figura 22 e Tabela 15 apresentam o cromatograma obtido por HPLC-DAD dos carotenoides obtidos pelo sistema batelada alimentada e os compostos identificados, respectivamente. Observa-se a separação de quatro carotenoides, que foram identificados baseados na ordem de eluição, tempo de retenção, espectros de absorção, íons moleculares e fragmentos gerados. Os dados referentes à

concentração ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) e quantificação por área (%) foram obtidos a partir da curva do padrão β -caroteno.

Figura 22- Cromatograma obtido por HPLC-DAD dos carotenoides por processo de batelada alimentada.

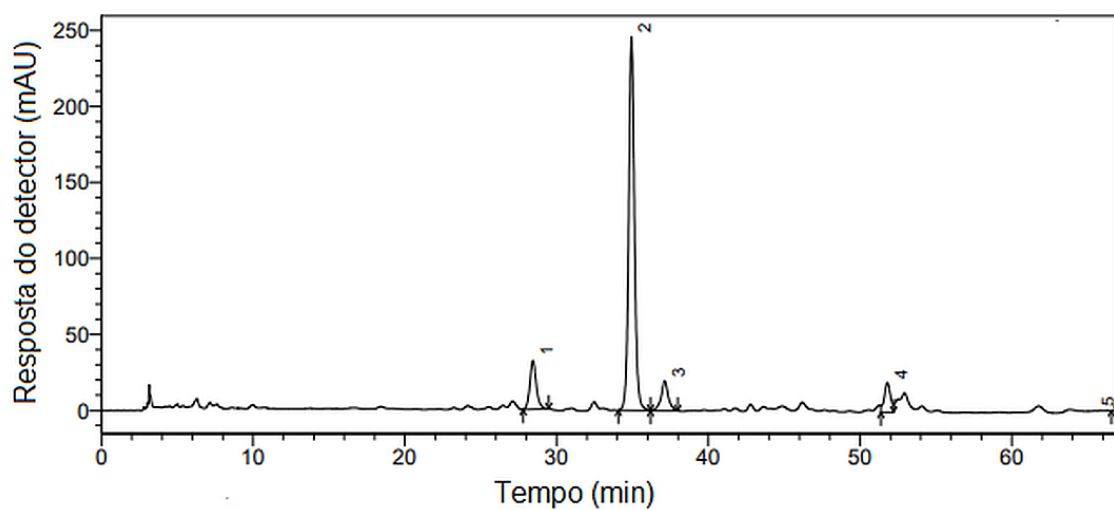


Tabela 15- Composição dos carotenoides obtidos por *P. rhodozyma* Y-17268 em batelada alimentada dos picos do cromatograma.

Pico ^a	Carotenoide	Concentração (µg/g peso seco) ^b	t _r ^c (min)	λ _{max} ^d (nm)	%III/II ^e	%A _B /A _{II} ^f	Quantificação por área ^g (%)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)
1	(13Z)-β-caroteno	5,08	28,4	338, 443, 469	5	41	11,13	537	444[M-92] ⁺
2	(all- <i>E</i>)-β-caroteno	10,24	34,9	451, 476	22	0	75,92	537	444[M-92] ⁺
3	(9Z)-β-caroteno	3,42	37,1	345, 447, 471	24	6	7,43	537	n.i. ^h
4	γ-caroteno	3,02	51,8	460, 491	50	0	5,52	537	n.i. ^h

^a Numerado de acordo com o cromatograma da Figura 22.

^b Picos quantificados quanto ao β-caroteno.

^c Tempo de retenção na coluna C₃₀.

^d Gradiente linear de metanol: MTBE..

^e Estrutura fina espectral: relação entre a altura do pico com absorção do maior comprimento de onda (III) e o pico de média absorção (II).

^f Relação entre o pico *cis* (AB) e o pico de média absorção (II).

^g Porcentagem em relação à área geral do cromatograma da Figura 22.

^h Nd: fragmentos não identificado.

De acordo com a Tabela 15 e Figura 22 observam-se a presença de β -caroteno (e seus isômeros) e γ -caroteno. O β -caroteno foi identificado como composto majoritário, representando em média 76% do total de carotenoides e uma concentração de 10,24 $\mu\text{g/g}$ (peso seco). Um percentual significativamente inferior foi observado para γ -caroteno, representando em média 5% (3,02 $\mu\text{g/g}$).

Tais resultados discordam da maioria dos relatos da literatura, onde o composto majoritário produzido pela levedura *P. rhodozyma* é a astaxantina (JIANG et al., 2017; DU et al., 2016; XIAO et al., 2015; YIN et al., 2013; BHATT et al., 2013; FONTANA et al., 1996; MEYER e PREEZ, 1994).

Estes resultados podem estar relacionados com o tipo cepa, bem como as condições operacionais utilizadas na bioprodução (biorreator com 75 mL de alimentação a cada 12 h, 1,5 vvm de aeração, 250 rpm de agitação, 25°C por 96 h) e com o meio composto por resíduos agroindustriais (20 g/L de APA, 100 g/L de AMM e 100 g/L de glicerol).

No entanto, os resultados obtidos estão de acordo com o encontrado por Cipolatti et al. (2015) que em avaliação do perfil carotenogênico do extrato obtido do cultivo de *P. rhodozyma*, verifica a presença de β -caroteno, luteína e astaxantina, sendo o β -caroteno quantificado como majoritário.

Desta forma, nas condições empregadas de processo, com a dada cepa, o carotenoide produzido majoritariamente é o β -caroteno, levando em consideração não apenas o pico obtido, mas também o espectro de massas.

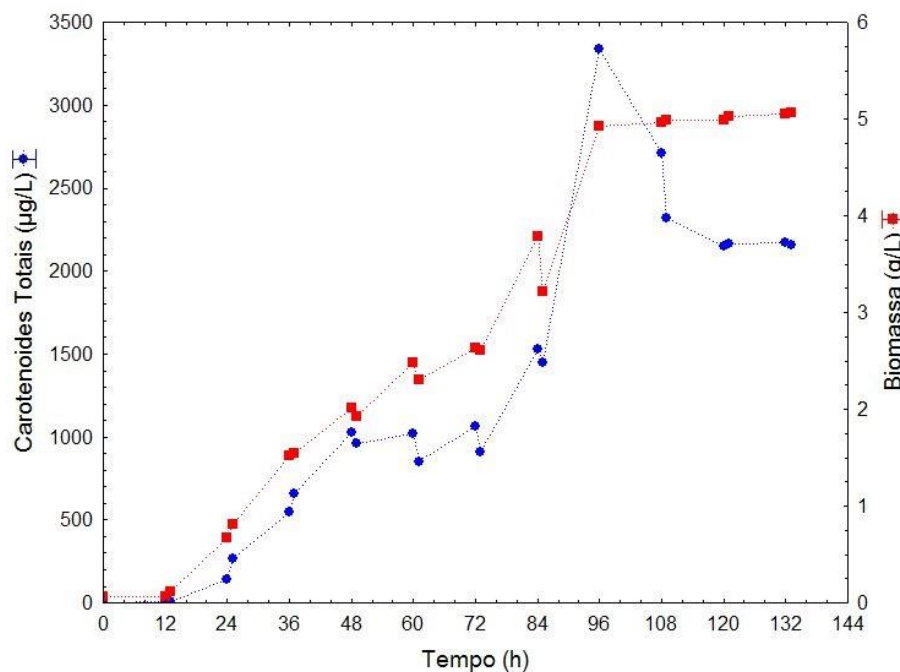
Como o carotenoide majoritário é o β -caroteno representando juntamente com seus isômeros *cis* e *trans*, em média 95% do total de carotenoides. Neste caso, o resultado otimizado em sistema batelada alimentada para os carotenoides totais e específicos foram convertidos levando em consideração coeficiente de absortividade do β -caroteno em éter de petróleo ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$). Na Tabela 16 são apresentados os resultados para carotenoides específicos e carotenoides totais em função do carotenoide majoritário (β -caroteno).

Tabela 16- Cinética da bioprodução de carotenoides específicos e totais para ensaio em batelada alimentada com volume de alimentação de 75 mL a cada 12 h, expresso em termos do β -caroteno.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenoides Específicos ($\mu\text{g/g}$)	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)
0	0,06	4,02	20,68	1,65
12	0,07	3,86	88,73	5,76
12'	0,11	3,86	104,08	10,30
24	0,67	4,06	215,05	144,08
24'	0,81	4,06	330,09	267,80
36	1,52	6,29	360,67	548,21
36'	1,54	6,05	427,84	658,87
48	2,01	6,41	510,03	1030,27
48'	1,93	6,11	490,15	958,74
60	2,48	6,14	407,33	1018,33
60'	2,31	5,87	369,59	853,78
72	2,64	6,12	401,89	1060,98
72'	2,61	5,86	347,76	907,65
84	3,79	5,77	402,78	1530,55
84'	3,22	5,31	447,31	1444,76
96	4,93	5,63	676,78	3336,53
108	4,97	5,37	544,78	2707,53
108'	4,99	5,6	465,35	2322,07
120	4,99	5,31	430,62	2148,80
120'	5,03	5,47	429,55	2160,65
132	5,05	5,2	429,52	2169,03
132'	5,07	5,4	425,65	2158,03

*tempos acompanhados do símbolo sobrescrito são referentes às coletas após à alimentação.

Figura 23- Cinética de produção de carotenoides totais e biomassa de *P. rhodozyma* para ensaio em batelada alimentada com uma taxa de alimentação de 75 mL a cada 12 h em função do carotenoide majoritário.



A máxima produção de carotenoides totais foi de 3336,53 µg/L em 96 h de bioprodução (Tabela 16 e Figura 23). Os demais dados cinéticos (consumo de substrato) e parâmetros estequiométricos (Figura 13b, Figura 17- Ensaio2, Figura 18- Ensaio 2, Figura 19b, Figura 20b, Figura 21b) mantiveram-se iguais, devido ao comportamento proporcional dos resultados.

5. CONCLUSÕES

A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

Nos ensaios em frascos agitados a máxima produção de carotenoides específicos foi de 335 $\mu\text{g/g}$ ao utilizar 100 g/L de AMM, 100 g/L de glicerol e 20 g/L de APA, 180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0 e 96 h.

Ao estudar os efeitos da agitação e aeração em biorreator batelada simples, houve a otimização da produção de carotenoides, o qual obteve-se o teor máximo de carotenoides totais de 2179 $\mu\text{g/L}$ (488 $\mu\text{g/g}$ carotenoides específicos) em uma região próxima a 1,5 vvm de aeração e 250 rpm de agitação em 60 h de processo utilizando meio composto por 100 g/L de AMM, 100 g/L de glicerol e 20 g/L de APA.

Ao realizar um estudo cinético da bioprodução em batelada simples, a máxima concentração de carotenoides totais foi de 2200 $\mu\text{g/L}$ (638 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos) em 72 h de processo, demonstrando um aumento em relação aos valores obtidos em frascos agitados. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *P. rhodozyma* em biorreator batelada simples foi de 0,139 h^{-1} com uma produtividade máxima em células de 0,049 g/L.h.

Já ao conduzir o processo em batelada alimentada, a máxima concentração de carotenoides totais obtida foi de 4118 $\mu\text{g/L}$ (835 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos) em 96 h, com uma alimentação de 75 mL de meio a cada 12 h. O sistema de biorreator batelada alimentada promoveu um incremento de aproximadamente 1,87 vezes na produção de carotenoides quando comparada ao sistema batelada simples e 2,5 vezes superior aos frascos agitados.

Em batelada alimentada, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *P. rhodozyma* é de 0,188 h^{-1} com uma produtividade máxima em células de 0,05 g/L.h, valores superiores aos obtidos em batelada simples.

O β -caroteno foi identificado como composto majoritário, representando em média 76% do total de carotenoides e o γ -caroteno apresenta-se em quantidades em torno de 5% dos carotenoides totais.

Ao analisar os resultados obtidos na bioprodução de carotenoides de *P. rhodozyma* Y-17268, o processo de batelada alimentada com uma alimentação de 75 mL a cada 12 h seria o processo recomendado para aumento de escala industrial,

levando assim a um incremento na produção e consequente aumento nos rendimentos.

A utilização de glicerol, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz é uma alternativa viável para produção de carotenoides, principalmente pois os Brasil é rico nestes substratos além de serem de baixo custo, ou seja, o uso de resíduos (coprodutos) além de tornar o processo menos dispendioso, apresenta-se como uma alternativa ao descarte inadequado desses produtos, visto que são ricos em material orgânico.

Diante do exposto, o presente estudo apresenta uma opção viável de produção de carotenoides, levando-se em consideração que o bioproduto gerado é considerado natural e pode ser aplicado em alimentos sem apresentar riscos à saúde do consumidor. Além disso, o uso de substratos de menor valor, torna-o, aplicável.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

1. Realizar alimentação com menor fonte de carbono, e/ou reciclo de substrato visto que não houve o consumo total deste nutriente no meio no processo de batelada alimentada;
2. Realizar produção de carotenoides em biorreator no processo semicontínuo utilizando diferentes sistemas de cortes;
3. Realizar modelagem matemática do processo otimizado;
4. Microencapsular os carotenoides produzidos em diferentes sistemas;
5. Realizar aplicação dos carotenoides microencapsulados;
6. Avaliar atividade biológicas dos compostos produzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 2169-2173, 1997.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, **McGraw- Hill Book Company**, 2^a ed., p. 984, 1986.
- BCC. **Global carotenoids market value by product type**. 2015. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>>. Acesso em: 21 abr. 2017.
- BHATT, P.C.; AHMAD, M.; PANDA, B.P. Enhanced bioaccumulation of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma* by utilizing low-cost agro products as fermentation substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 58-63, 2013.
- BHOSALE, P.; GADRE, R.V. β -carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. **Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 327-332, 2001.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 351-361, 2004.
- BONFIM, T. M. B. Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo. Curitiba, PR. 158f. **Tese** (Doutorado em Ciências, Setor de Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, UFPR, 1999.
- BORRONI, V.; GONZÁLEZ, M. T.; CARELLI, A. A. Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill waste as the substrate. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 128-134, 2017.
- BORZANI, W.; SHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnología Industrial**. Editora Edgard Blucher Ltda., v.II., São Paulo, 2001.
- 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.
- 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.
- CAMARGO, A. P. S. Extração supercrítica de astaxantina e lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). 2010.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

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.

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.

CIPOLATTI, E. ; BULSING, B. ; SÁ, C. S. ; BURKERT, C. A. V. ; FURLONG, E. B. ; BURKERT, J. F. M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, v.14, p. 1982-1988, 2015.

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

COLET, R. Bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em batelada alimentada e semi-contínuo com resíduos agroindustriais. 2016. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2016.

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.

DAS, A.; YOON, S- H.; LEE, S- L.; KIM, J- Y.; OH, D- K.; KIM; S- W. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 505–512, 2007.

DA SILVA, T.L.; ROSEIRO, J.C.; REIS, A. Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. **Trends in Biotechnology**, v. 30(4), p. 22-232, 2012.

DA SILVA, N.A.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A.Z.; DE ROSSO, V.V. Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5072-5084, 2014.

DA SILVA, M. C. Alteração na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos. 2004. **Tese** (Doutorado em ciência de alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

DAVIES, B. H. **Carotenoid**. In T. W. Goodwin (Ed.), Chemical biochemistry plant pigments. New York: Academic, 1976.

DAVIOLI, 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.

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

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.

DIPRAT, A.B.; MENEGOL, T.; BOELTER, J.F.; ZMOZINSKI, A.; VALE, M.G.R.; RODRIGUES, E.; RECH, R. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3463-3468, 2016.

DU, X.; DONG, C.; WANG, K.; JIANG, Z.; CHEN, Y.; YANG, Y.; CHEN, F.; NI, H. Separation and purification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by preparative high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1029-1030, p. 191-197, 2016.

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, 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.

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.

FILHO, G. L.; DE ROSSO, V. V.; MEIRELES, M.A.A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia Uniflora* L.). **The journal of supercritical fluids**, v. 46, p. 33-39, 2008.

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.

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

GOTO, M.; KANDA, H.; WAHYUDIONO, K.; MACHMUDAH, S. Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO₂ and subcritical dimethyl ether. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 245-251, 2015.

GONG, M., BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology advances**, v. 34, p. 1396-1412, 2016.

GRANADO-LORENCIO, F.; BLANCO-NAVARRO, I.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, E. Biomarkers of carotenoid bioavailability. **Food Research International**, v. 99, p. 902-916, 2017.

HOFER, A.; HAUER, S.; KROLL, P.; FRICKE, J.; HERWIG, C. In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum*. **Process Biochemistry**, in press, 2018.

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

HU, Z. C.; ZHENG, Y.; WANG, Z.; SHEN, Y. Production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* ZJUT46 with Fed-Batch Fermentation in 2.0 M³ Fermentor. **Food Technology Biotechnology**, v. 45, p. 209-212. 2007.

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.

JACQUES, R.A.; OLIVEIRA, A.P.; FREITAS, L.S.; CARAMÃO, E.B.; OLIVEIRA, J.V.; DARIVA, C. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.14, p. 6-12, 2007.

JANISZEWSKA-TURAK, E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. **Food Research International**, v. 99, p. 891-901, 2017.

JIANG, G.L.; ZHOU, L.Y.; WANG, Y.T; ZHU, M.J. Astaxanthin from Jerusalem artichoke: production by fed-batch fermentation using *Phaffia rhodozyma* and applications in cosmetics. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 16-25, 2017.

JOHNSON, E. A. et al. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, v.115, p. 173-183, 1989.

JOHNSON, E. A.; GIL- HWAN, A. N. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Microbiology and Serology**, v.57, p.191-202, 1991.

JUSZCZYK, P.; TOMASZEWSKA, L.; KITA, A.; RYMOWICZ, W. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 124-131, 2013.

LATHA, B.V.; JEEVARATNAM, K.; MURALI, H.S.; MANJA, K.S. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DER-PDY from natural source. **Indian Journal of Biotechnology**, v.4, p. 53–357, 2005.

LA FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; DEL VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, p. 90-95, 2006.

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

LIU, X.; WANG, X.; XU, J.; XIA, J.; LV, J.; ZHANG, T.; WU, Z.; DENG, Y.; HE, J. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using corn steep liquor as a source of organic nitrogen and vitamins. **Industrial crops and products**, v. 78, p. 154-160, 2015.

LIU, Y. S.; WU, J. Y.; HO, K.P. 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.

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.

LUENGO, E.; CONDÓN-ABANTO, S.; CONDÓN, S.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. **Separation and Purification Technology**, v. 136, p.130-136, 2014.

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.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of *Sastsuma mandarin* (Citrus unshiu Marc.) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5682-5690, 2008.

MACHADO, W.R.C.; BURKERT, J.F.M. Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 209-219, 2015.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 245-251, 2004.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; FERNANDEZ-SEVILLA, J.M.; ACIÉN FERNANDEZ, F.G.; CERÓN GARCIA, M.C.; GRIMMA, E.M. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**, v. 123, p. 928–935, 2010.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, p.202-212, 2005.

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.; SUNTORNUSUK, W. Optimization of beta-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2281-2287, 2008.

MANOWATTANA, A.; TECHAPUN, C.; WATANABE, M.; CHAYASO, T. Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in an airlift bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, p. 59-66, 2018.

MANTZORIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on β -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 123-135, 2002.

MATA-GÓMEZ, L.C.; MONTANEZ, J.C.; MÉNDEZ-SAVALA, A.; AGUILAR, C.N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial cell factories**, v.13, p. 13-23, 2014.

MATTEA, F.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Carotenoid processing with supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 255-265, 2008.

MEARS, L.; STOCKS, S.M.; SIN, G.; GERNAEY, K.V. A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. **Journal of Biotechnology**, v. 245, p. 34-46, 2017.

MENDES- PINTO, M. M.; Raposo, M. F. J.; BOWEN, J.; YOUNG, A. J.; MORAIS, R. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications. **Journal of Applied Physiology**, v. 13, p. 19-24, 2010.

MERCADANTE, A.Z.; RODRIGUES, D.B; PETRY, F.C.; MARIUTTI, L.R.B. Carotenoids esters in foods: A review and practical directions on analysis and occurrence. **Food Research International**, v. 99, p. 230-250, 2017.

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

MEYER, P.S.; PREEZ, J.C.D. Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, p. 24-31, 1994.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S.R.S. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. **Journal of Chemistry**, v. 2016, p. 16, 2016.

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.

MILLER, M.W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. Phaffia, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 26, n.2, p. 286-291, 1976.

MOLINÉ, M.; FLORES, M.R.; LIBKIND, D.; DEL CARMEN, D.M.; FARÍAS, M.E.; VAN BROOCK, M. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. **Photochemistry Photobiology Science**, v.9, p. 1145-1151, 2010.

MONKS, L.; RIGO, A.; MAZZUTTI, M.A.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assited methods for cell disruption to obtain carotenoids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 165-169. 2013.

MONKS, L.; TIGGAMANN, L.; MAZUTI, M. A.; OLIVEIRA, V. J.; VALDUGA, E. Assesment of Carotenoids Recovery through Cell Rupture os *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using compressed fluids. **Food Bioprocess Technology**, v.5, p. 2353-2359, 2011.

MUKHERJEE, C.; CHOWDHURY, R.; SUTRADHAR, T.; BEGAM, M.; GHOSH, S.M.; BASAK, S.K.; RAY, K. Parboiled rice effluent: A wastewater niche for microalgae and cyanobacteria with growth coupled to comprehensive remediation and phosphorus biofertilization. **Algal Research**, v. 19, p. 225-236, 2016.

MURILLO, E. Far UV peaks contribute for identification of carotenoids *E/Z* isomers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 159-162, 2018.

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 at Biophysica Acta**, v. 1807, n. 9, p. 1056-1063, 2011.

NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell wall of several yeast species. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 206-212, 1998.

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.

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.

PONKA, R.; FOKOU, E.; KANSCI, G.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; LEONIL, J.; GAUCHERON, F. Amino acids, major carotenoids and vitamin A activity of some traditional sauces consumed in the Far North Region of Cameroon. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 43, p. 88-95. 2015.

RAMIREZ, J.; OBLEDO, N.; ARELLANO, M.; HERRERA, E. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fed-batch culture using a low cost medium feeding. **E-Gnosis**, v. 4, p. 1-9, 2006.

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

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.

RODRIGUES-AMAYA, D.B; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008.

RODRIGUES, D.B.; MARIUTTI, L.R.B.; MERCADANTE, A. Z. Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1457, p. 116-124, 2016.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª ed., Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *solanum sessiliflorum*, 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.

SA, T.N.M.; LANDIM, P.G.C.; LEITE, A.K.F.; RODRIGUES, S. Produção de carotenoides 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.

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.

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGE, 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.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: **Editora Blücher**, v. 2, 2001.

SEABRA, L.M.J.; PEDROSA, L.F.C. Astaxantina: aspectos estruturais e funcionais. **Revista de Nutrição**. v. 23, p. 1041-1050, 2010.

SHIRSATH, S.R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. **Chemical Engineering and processing: Process Intensification**, v.53, p.10-23, 2012.

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, C.M.; BORBA, T. M.; KALIL, S.J.; BURKERT, J.F.M. Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: effect of composition of culture medium and initial pH, **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 489-496, 2016.

SILVA, D. A. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* utilizando água de parboilização de arroz. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Rio Grande. 2009.

SOWMYA, R.; SACHINDRA, N.M. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system. **Food Chemistry**, v. 134, p. 308-314. 2012.

STASIAK-RÓSANKA, L.; BLAZEJAK, S.; GIENTKA, I.; BZDUCHA-WRÓBEL, A.; LIPINSKA, E. Utilization of a waste glycerol fraction using and reusing immobilized *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 cell extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 44-48, 2017.

SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 37, p. 397-408, 2006.

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

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.

TASTCH, P. T. Produção de carotenoides 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.

URNAU, L. Produção e recuperação de carotenoides de *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921. **Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim. 2014.

URNAU, L.; COLET, R.; SOARES, V.F.; FRANCESCHI, E.; VALDUGA, E.; STEFFENS, C. Extraction of Carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using Ultrasound-Assisted and Chemical Cell Disruption Methods. **The Canadian journal of chemical engineering**, v. 96, p.1377-1381, 2018.

URSACHE, F.M., ANDRONOIU, D.G., GHINEA, I.O., BARBU, V., IONITA, E. COTARLET, E., DUMITRASCU, L., BOTEZ, E., RAPEANU, G., STANCIUC, N. Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products. **Journal of food engineering**, v. 19, p. 1-9, 2018.

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

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**, v. 232, p. 453-462, 2011.

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 CBS 2636. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1060 - 1065, 2009.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 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 and Technology**, v.44, p. 2445-2551, 2009c.

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

VALDUGA, E.; 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 carotenoides. **Química Nova**, v. 30, p. 1860-1866, 2007.

WAGNER, J.R.; RAMBLA, M.A.O.; LEGARRETA, I.G. **Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos**. 1ªed. Bernal: Universidad Nacional de Quilmes, 2008.

WANG, E.; DONG, C.; PARK, R.F.; ROBERTS, T.H. Carotenoid pigments in rust fungi: extraction, separation, quantification and characterization. **Fungal Biology Reviews**, 2018.

XIAO, A.; JIANG, X.; NI, H.; YANG, Q.; CAI, H. Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation during *Phaffia rhodozyma* fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 148-153, 2015.

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

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

YIN, C.; YANG, S.; LIU, X.; YAN, H. Efficient extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* with polar and non-polar solvents after acid washing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, p. 776-780, 2013.

YO, A.Y.; ALNAEELI, M.; PARK, J.K. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY01. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 463-473, 2016.

YUAN-SHUAI, L.; JIAN-YONG, W. Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production, **Biotechnology and Bioengineering**, v.101, p. 996–1004, 2008.

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.

ZAGHDOUDI, K.; PONTVIANNE, S.; FRAMBOISIER, X.; ACHARD, M.; KUDAIBERGENOVA, R.; AYADI-TRABELSI, M.; KALTHOUM-CHERIF, J.; VANDERESSE, R.; FROCHOT, C. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Food Chemistry**, v. 184, p. 131-139, 2015.

ZENI, J. Screening de microrganismos produtores de carotenoides. **Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos**. Universidade Regional Integrada. Erechim. 2009.

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.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Resultados do planejamento experimental para recuperação de carotenoides específicos em frascos agitados.

Tabela A1- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para os carotenoides específico em frascos agitados.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média*	322,64	7,10	45,43	0,00048
(1) AMM (L)	-29,25	8,71	-3,35	0,07836
AMM (Q)*	-56,02	10,39	-5,39	0,03273
(2) Glicerol (L)	1,42	8,71	0,16	0,88503
Glicerol (Q)*	-84,89	10,39	-8,16	0,01466
1L.2L	-8,75	12,30	-0,71	0,055064

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

Tabela A2- Análise de variância para a produção de carotenoides específicos, do planejamento fatorial completo 2² em frascos agitados.

<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	11592,79	2	5796,39	6,05
Resíduo	7656,12	8	957,01	
Falta de Ajuste	7353,51	6		
Erro Puro	302,62	2		
Total	19248,92	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,84, F_{tab,95%}=4,56

APÊNDICE B- Resultados do planejamento experimental para recuperação de carotenoides totais de *P. rhodozyma* em biorreator batelada simples.

Tabela B1- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para os carotenoides totais.

	<i>Coeficientes de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>p</i>
Média*	2120,40	30,30	69,96	0,00020
(1) Aeração (L)	2,32	18,58	0,12	0,91185
Aeração (Q)*	-253,93	22,17	-11,44	0,00754
(2) Agitação (L)*	381,20	18,58	20,50	0,00236
Agitação (Q)*	-387,01	22,17	-17,44	0,00326
1L.2L	-2,36	26,24	-0,09	0,93634

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

Tabela B2- Análise de variância para a bioprodução de carotenoides totais em biorreator batelada simples, do planejamento fatorial completo 2².

<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F calculado</i>
Regressão	2120085,29	3	706695	5,64
Resíduo	876706,78	7	125244	
Falta de Ajuste	871195	5		
Erro Puro	5511	2		
Total	2996792	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de Correlação R= 0,85, F_{tab,95%}=4,35

APÊNDICE C

Tabela C1- Cinética da bioprodução de carotenoides e biomassa da levedura *P. rhodozyma*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para ensaio em batelada.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenoides Específicos (µg/g)	Carotenoides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,105	4	15,26	1,6	18,97	0,1809	34,42
12	0,185	4,2	63,28	11,7	19,03	0,1708	34,49
24	0,983	5,01	237,24	233,2	16,22	0,0944	34,94
36	1,48	6,54	488,73	732,2	15,95	0,0900	31,9
48	2,06	6,55	608,92	1254,37	15,36	0,0931	27,59
60	2,75	6,53	629,47	2200,29	14,35	0,0962	27,58
72	3,32	6,45	638,79	2036,13	14,15	0,0911	27,32
78	3,79	6,38	601,87	2076,18	13,65	0,0912	25,88
84	3,81	6,35	491,93	1481,64	11,16	0,0841	23,40
96	4,88	6,32	489,25	1482,83	11,85	0,0781	22,9

Tabela C2- Cinética da bioprodução de carotenoides e biomassa da levedura *P. rhodozyma*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para ensaio em batelada alimentada com volume de alimentação de 50 mL a cada 12 horas.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenoides Específicos (µg/g)	Carotenoides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,108	4,0	15,42	3,39	31,89	0,1574	81,55
12	0,145	4,02	67,3	9,75	26,72	0,1565	60,36
12'	0,22	4,01	102,43	11,07	29,59	0,1571	63,24
24	0,24	4,03	127,49	12,74	27,48	0,1719	60,55
24'	0,35	4,03	136,9	15,3	29,9	0,1699	63,58
36	0,485	3,78	208,74	154,69	31,2	0,0992	63,43
36'	0,63	3,81	208,74	101,23	28,18	0,1066	69,72
48	1,13	6,51	307,27	193,87	31,14	0,0827	62,9
48'	1,072	6,28	400,14	588,45	30,89	0,0857	65,42
60	1,196	6,43	598,48	715,78	30,66	0,0789	62,11
60'	1,78	6,26	548,93	882,35	29,77	0,0812	67,89
72	2,9	6,4	495,7	1113,4	30,65	0,0791	65,28
72'	2,56	6,14	458,79	1162,07	29,84	0,09	68,23
84	2,56	6,3	450,23	1152,59	29,84	0,1046	63,38
84'	3,08	6,08	490,96	1256,85	29,72	0,11	68,52
96	3,25	6,23	494,89	1612,07	32,6	0,11	68,15

Tabela C3- Cinética da bioprodução de carotenoides e biomassa da levedura *P. rhodozyma*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para ensaio em batelada alimentada com volume de alimentação de 75 mL a cada 12 horas.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenoides Específicos (µg/g)	Carotenoides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,06	4,02	25,52	2,17	28,45	0,1923	59,27
12	0,07	3,86	109,52	7,22	25,23	0,2059	54,64
12'	0,11	3,86	128,47	12,84	26,4	0,1995	48,98
24	0,67	4,06	265,43	177,84	23,97	0,0967	45,3
24'	0,81	4,06	408,09	328,11	25,33	0,107	57,69
36	1,52	6,29	445,17	678,23	24,1	0,0885	56,69
36'	1,54	6,05	528,08	811,12	24,34	0,0961	59,17
48	2,01	6,41	629,52	1265,34	24,31	0,0966	57,52
48'	1,93	6,11	603,75	1185,30	44,84	0,0972	49,5
60	2,48	6,14	502,76	1246,84	42,7	0,0771	45,2
60'	2,31	5,87	456,19	1052,89	44,97	0,1102	57,05
72	2,64	6,12	496,04	1309,56	27,1	0,1144	41,19
72'	2,61	5,86	429,23	1120,31	67,41	0,1082	61,17
84	3,79	5,77	497,14	1882,18	55,31	0,0996	54,1
84'	3,22	5,31	552,09	1775,53	58,4	0,0555	28,05
96	4,93	5,63	835,34	4118,19	52,28	0,057	55,63
108	4,97	5,37	672,41	3341,87	50,74	0,042	39,38
108'	4,99	5,6	574,37	2866,11	52,81	0,051	47,24
120	4,99	5,31	531,51	2652,23	50,94	0,047	42,14
120'	5,03	5,47	530,19	2666,85	56,21	0,059	49,37
132	5,05	5,2	530,14	2667,20	49,44	0,050	40,64
132'	5,07	5,4	525,37	2663,62	53,98	0,054	53,87

*tempos acompanhados do símbolo sobrescrito são referentes às coletas após à alimentação.

Tabela C4- Cinética da bioprodução de carotenoides e biomassa da levedura *P. rhodozyma*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para ensaio em batelada alimentada com volume de alimentação de 112,5 mL a cada 12 horas.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenoides Específicos (µg/g)	Carotenoides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,27	4,05	17,47	4,29	40,61	0,1943	63,93
12	0,53	3,87	18,35	5,02	43,92	0,2241	77,62
12'	0,31	3,88	46,76	14,22	28,34	0,1563	59,71
24	1,29	6,26	228,57	294,85	29,39	0,0900	57,03
24'	0,88	5,87	326,28	289,74	36,52	0,1014	61,64
36	1,96	6,42	649,52	1271,76	27,69	0,0943	57,84
36'	1,29	5,98	421,62	544,73	32,85	0,1463	58,81
48	2,29	6,38	533,90	1222,64	35,81	0,1128	57,66
48'	2,24	6,02	584,38	1309,10	28,06	0,1114	59,23
60	2,91	6,15	676,95	1963,16	46,55	0,1183	55,41
60'	2,61	5,76	625,91	1627,36	57,94	0,1021	57,90
72	3,24	6,20	632,20	2048,31	25,32	0,0775	53,20
72'	3,36	5,85	529,92	1767,77	29,31	0,0983	56,74
84	4,03	5,88	394,96	1589,22	31,33	0,0876	51,28
84'	3,05	5,38	682,09	2070,16	29,11	0,0827	60,10
96	4,15	5,77	445,42	1848,81	24,54	0,0508	54,76

Tabela C5- Cinética da bioprodução de carotenoides e biomassa da levedura *P. rhodozyma*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para ensaio em batelada alimentada com volume de alimentação de 150 mL a cada 12 horas.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenoides Específicos (µg/g)	Carotenoides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,25	4,07	16,57	4,11	34,14	0,2053	68,45
12	0,22	3,79	18,39	4,06	44,60	0,2200	68,83
12'	0,14	3,84	69,33	9,72	41,82	0,1988	60,57
24	0,57	3,81	122,38	70,01	36,59	0,1415	68,23
24'	0,74	3,84	293,71	217,35	38,93	0,1380	59,63
36	1,21	6,58	565,82	678,97	37,01	0,0922	67,83
36'	1,10	6,15	612,62	679,89	36,92	0,0926	64,4
48	1,69	6,45	510,47	864,23	42,42	0,0879	70,52
48'	1,44	6,11	408,95	588,89	37,58	0,0935	67,7
60	2,34	6,41	458,58	1073,98	38,69	0,0659	71,59
60'	2,60	5,95	435,57	1129,88	45,45	0,0806	62,18
72	2,82	6,27	433,71	1218,24	33,61	0,072	72,93
72'	2,28	5,92	407,42	927,31	24,44	0,0799	63,93
84	4,17	6,18	418,76	1746,23	34,51	0,0485	70,85
84'	2,83	5,83	416,51	1800,24	36,06	0,0606	63,32
96	3,82	6,19	781,52	18807,42	43,91	0,0497	54,49

APÊNDICE D

Figura D1- Linearização do crescimento celular da levedura *P. rhodozyma* em biorreator batelada.

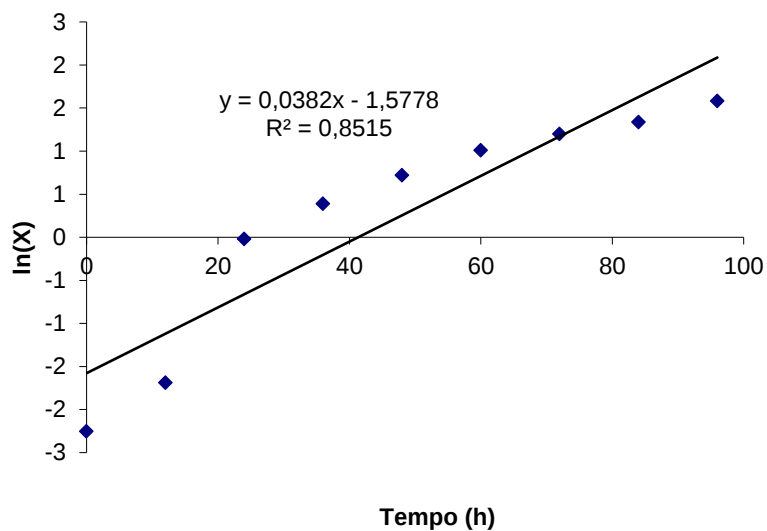
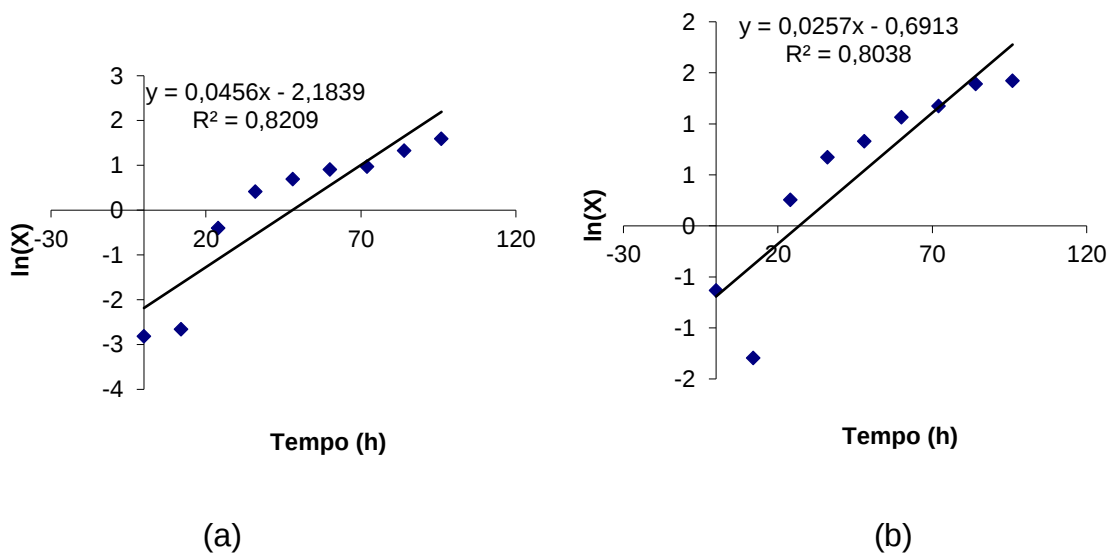


Figura D2- Linearização do crescimento celular da levedura *P. rhodozyma* em biorreator batelada alimentada no Ensaio 1 (a), Ensaio 2 (b), Ensaio 3 (c) e Ensaio 4



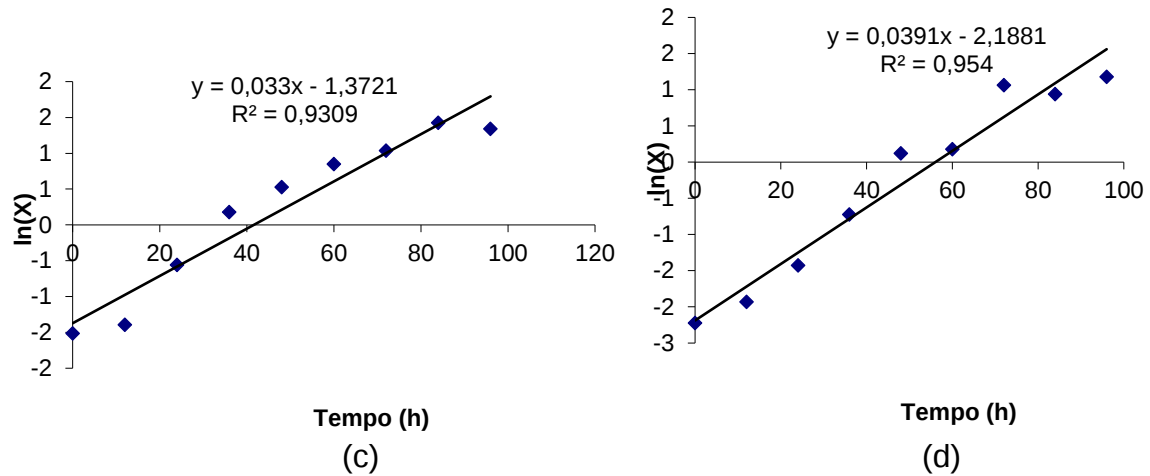


Figura D3 - Determinação do fator de conversão $Y_{x/s}$ com base em glicerol para batelada.

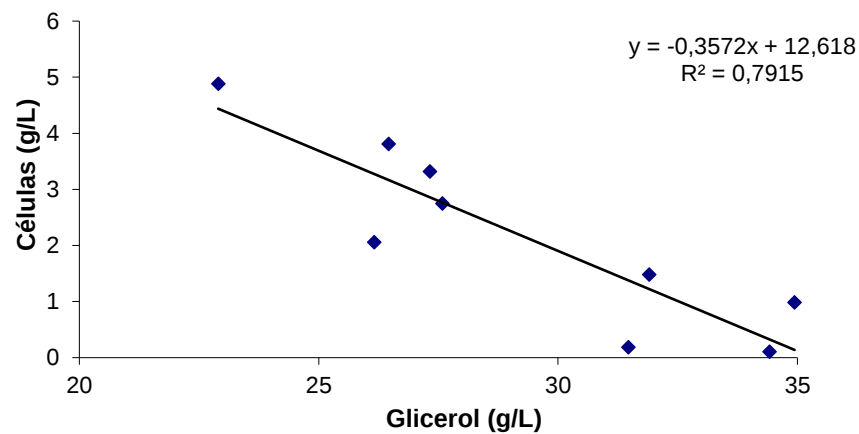
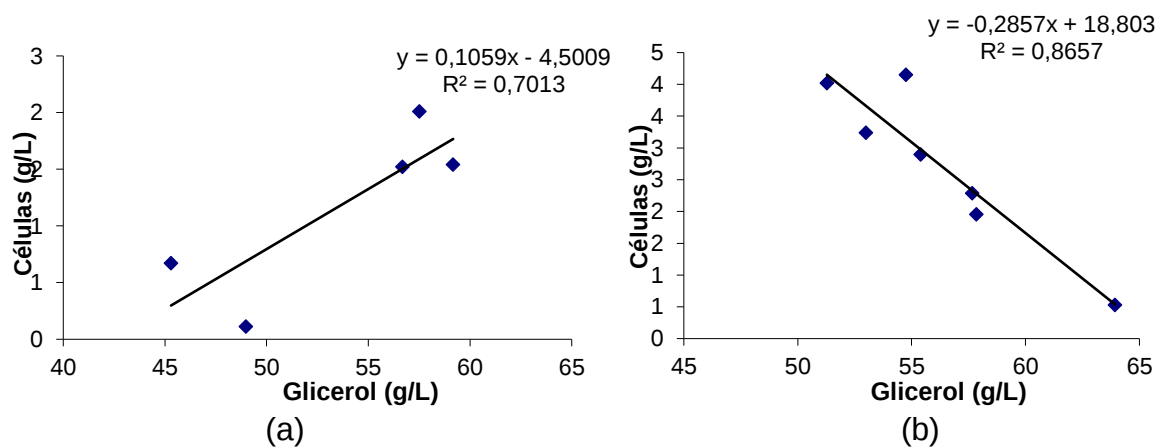


Figura D4 - Determinação do fator de conversão $Y_{x/s}$ com base em glicerol para o Ensaio 1 (a), para o Ensaio 2 (b), Ensaio 3 (c) e Ensaio 4 (d) em batelada alimentada.



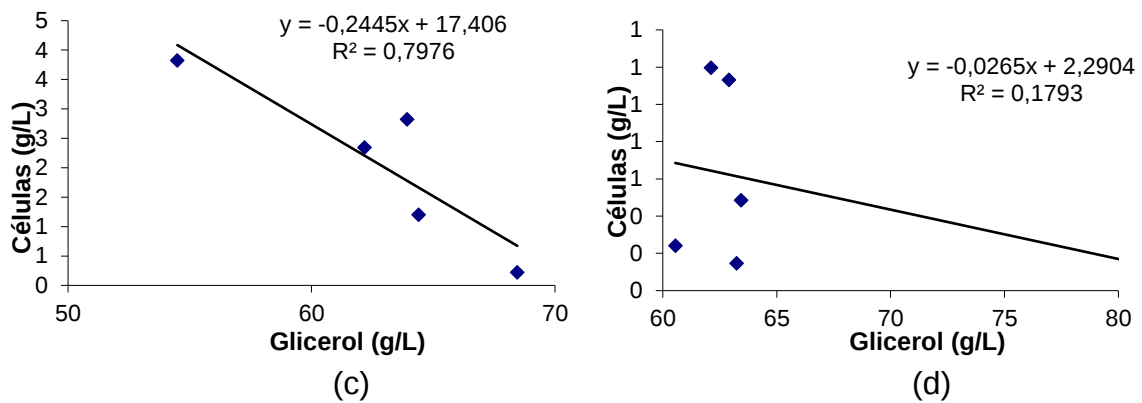


Figura D5 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para batelada.

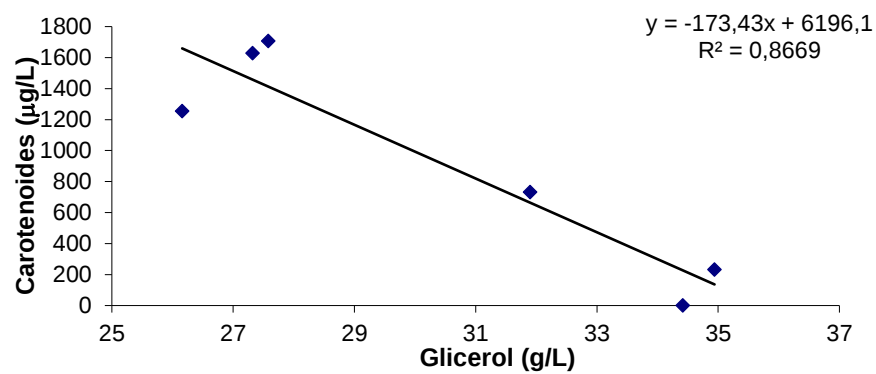
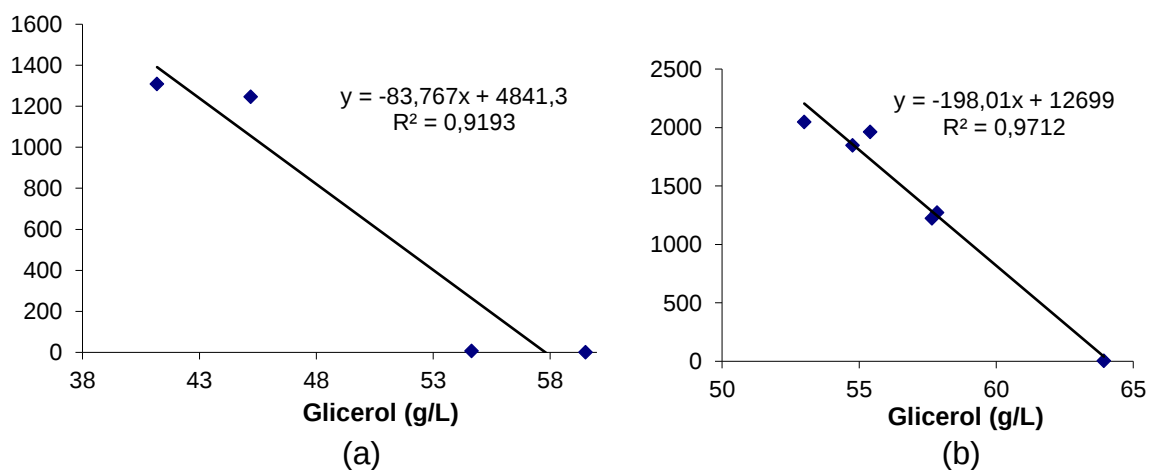


Figura D6 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 1(a), para o Ensaio 2 (b), Ensaio 3 (c) e Ensaio 4 (d), em batelada alimentada.



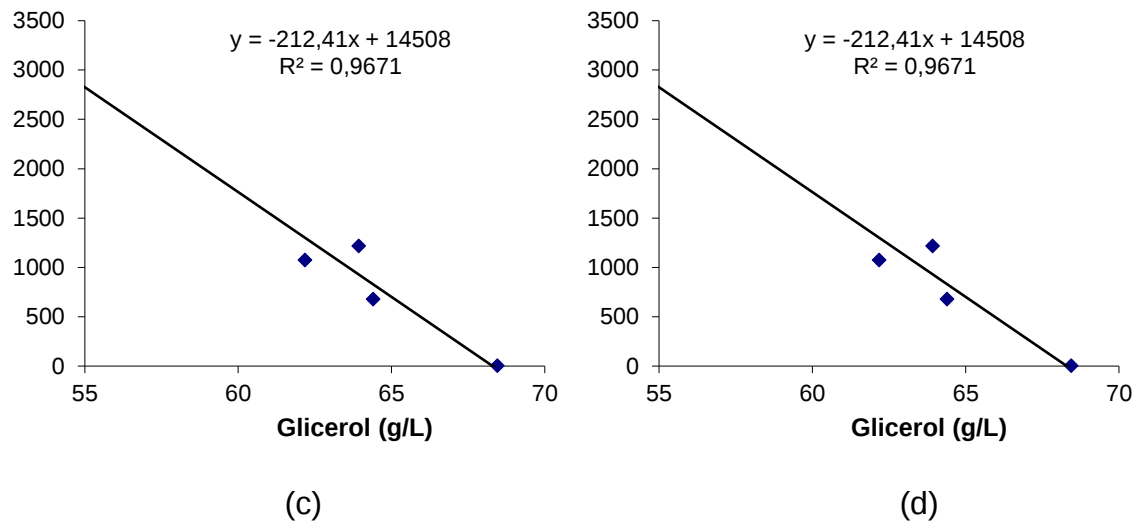


Figura D7 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para batelada.

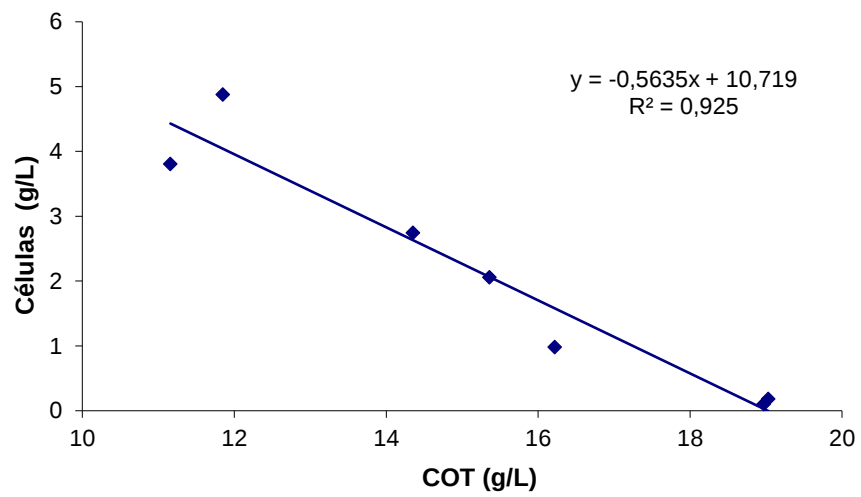


Figura D8 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o Ensaio 1(a), para o Ensaio 2 (b), Ensaio 3 (c) e Ensaio 4 (d) em batelada alimentada.

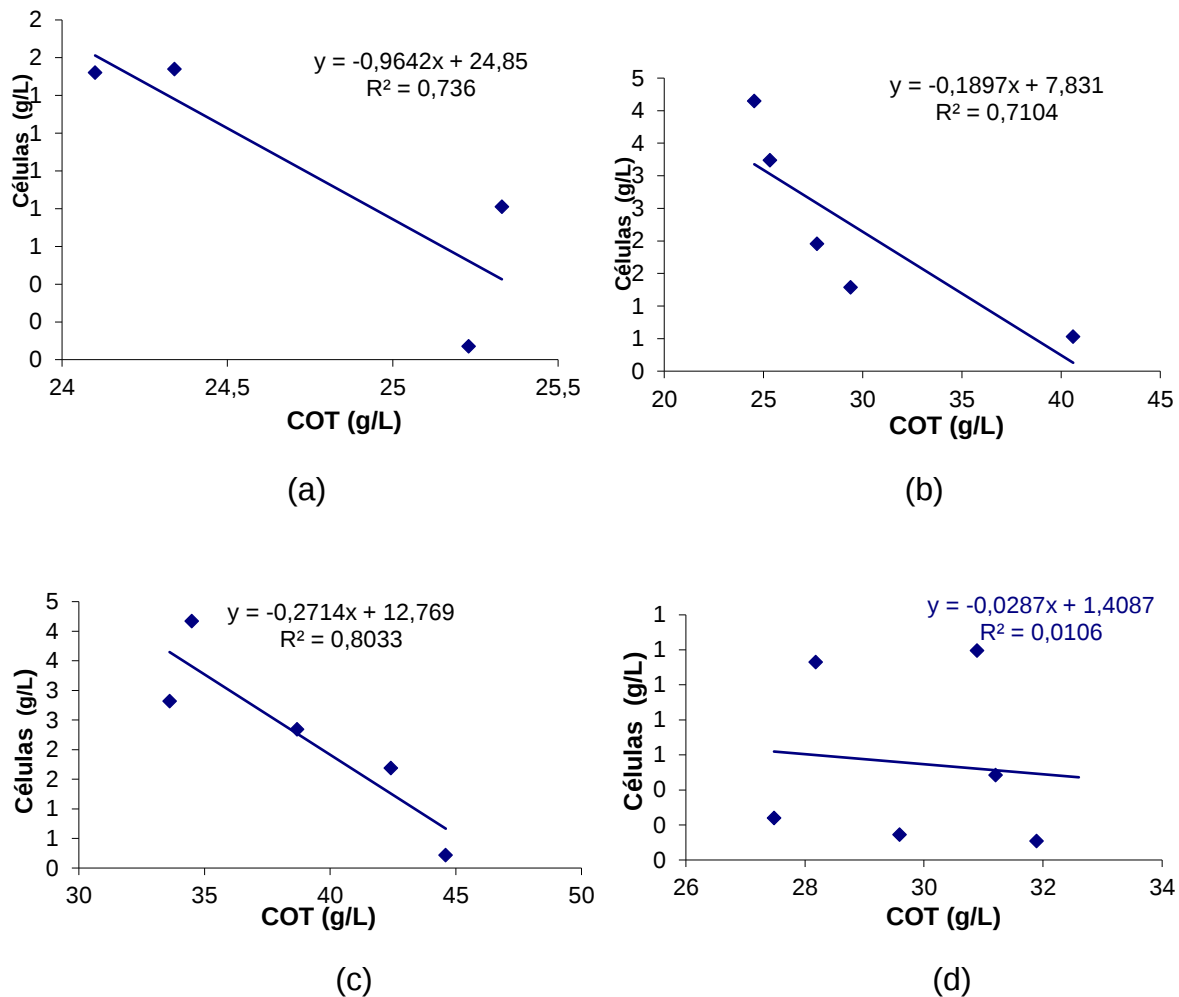


Figura D9 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para batelada.

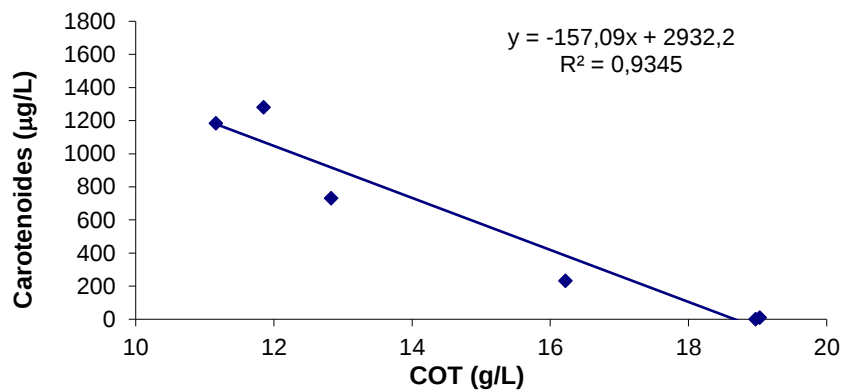


Figura D10 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o Ensaio 1(a), para o Ensaio 2 (b), Ensaio 3 (c) e Ensaio 4 (d), em batelada alimentada.

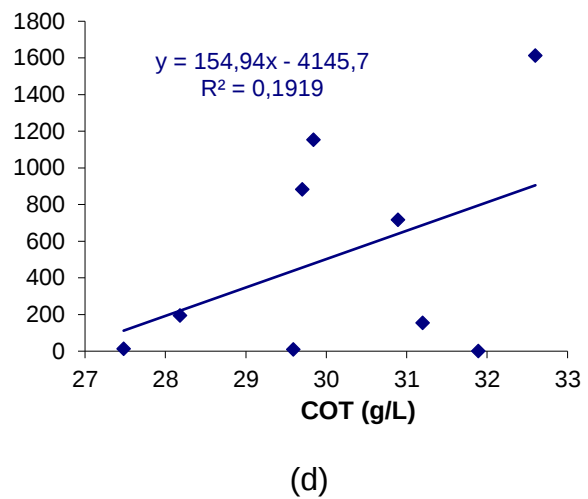
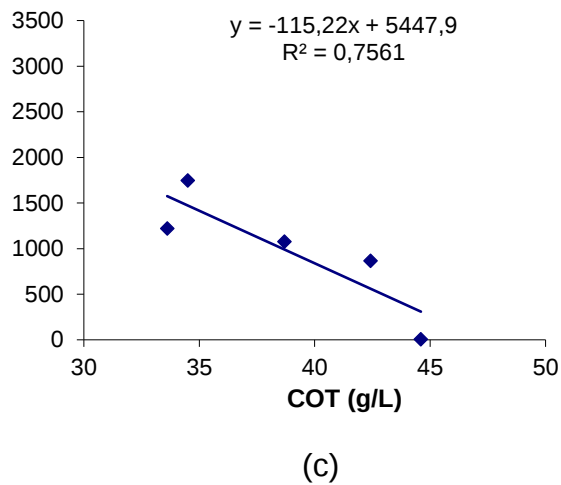
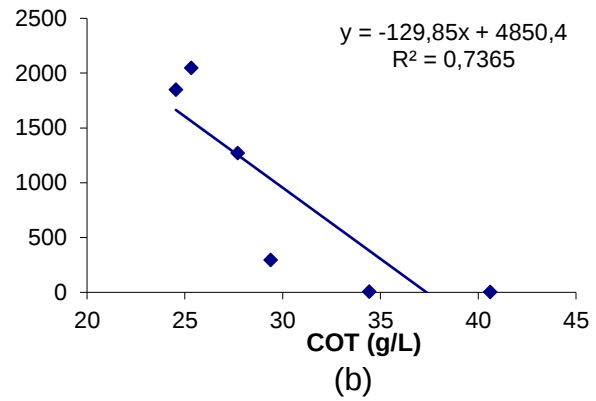
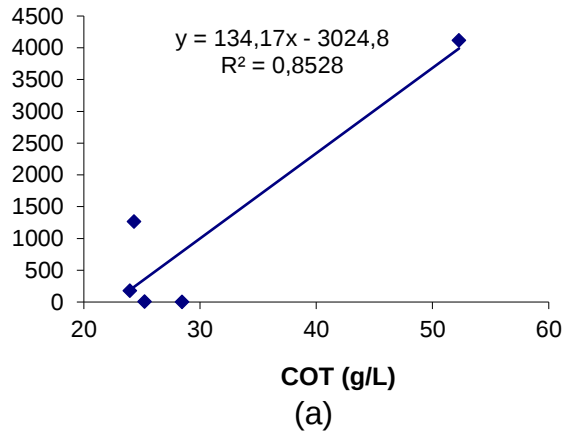


Figura D11- Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total em batelada.

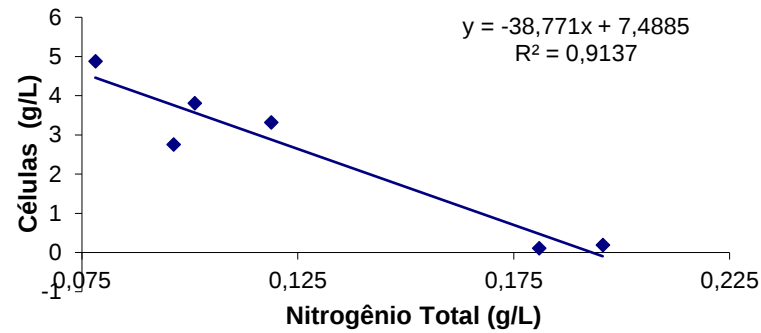
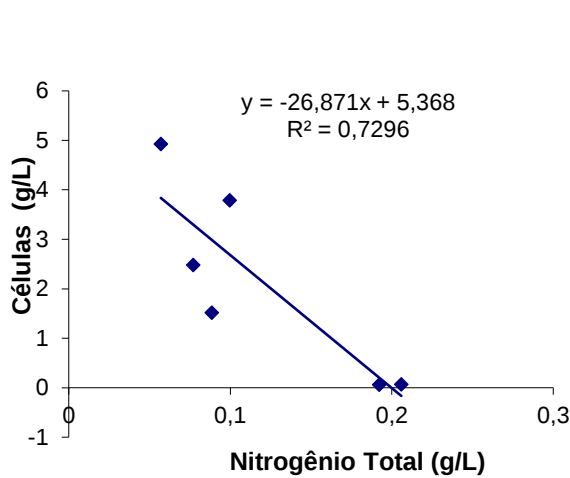
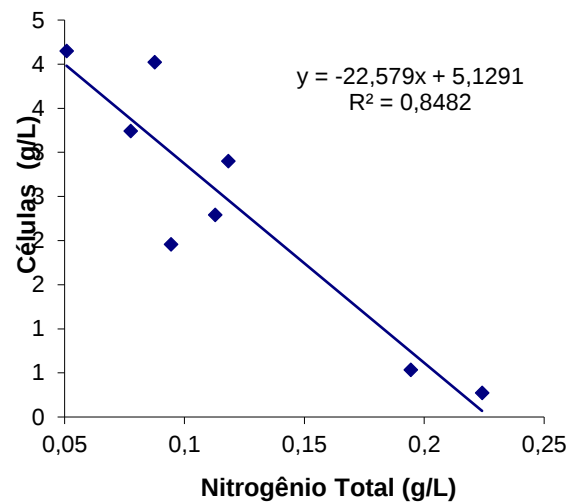


Figura D12 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 1(a), para o Ensaio 2 (b) e Ensaio 3 (c) em batelada alimentada.



(a)



(b)

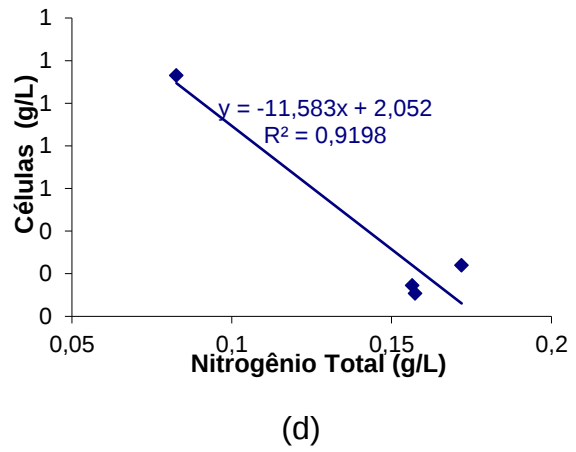
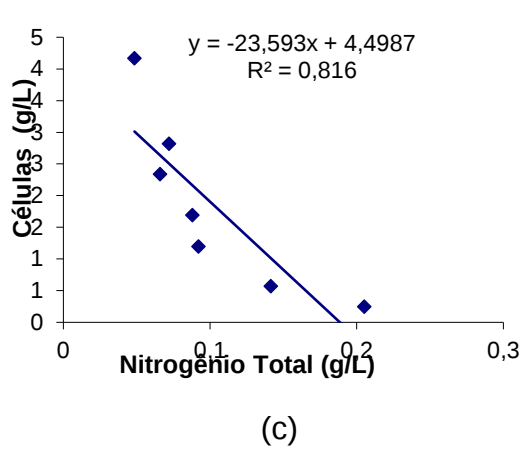


Figura D13 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para batelada.

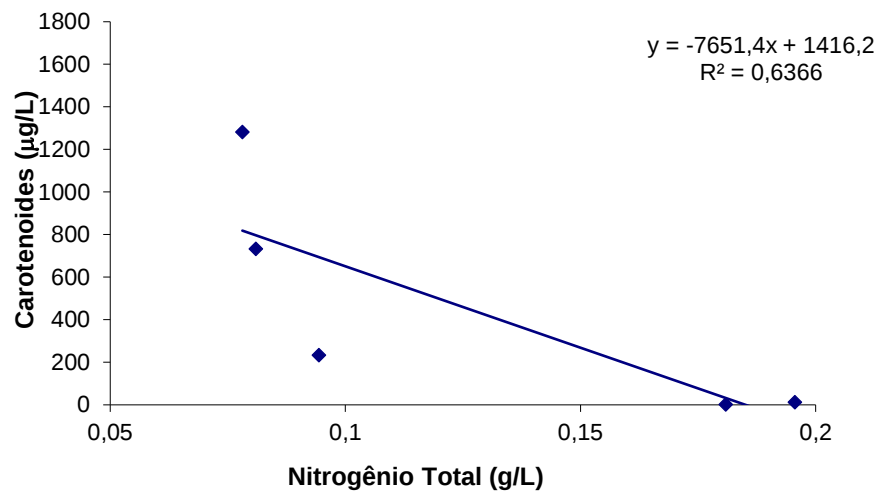
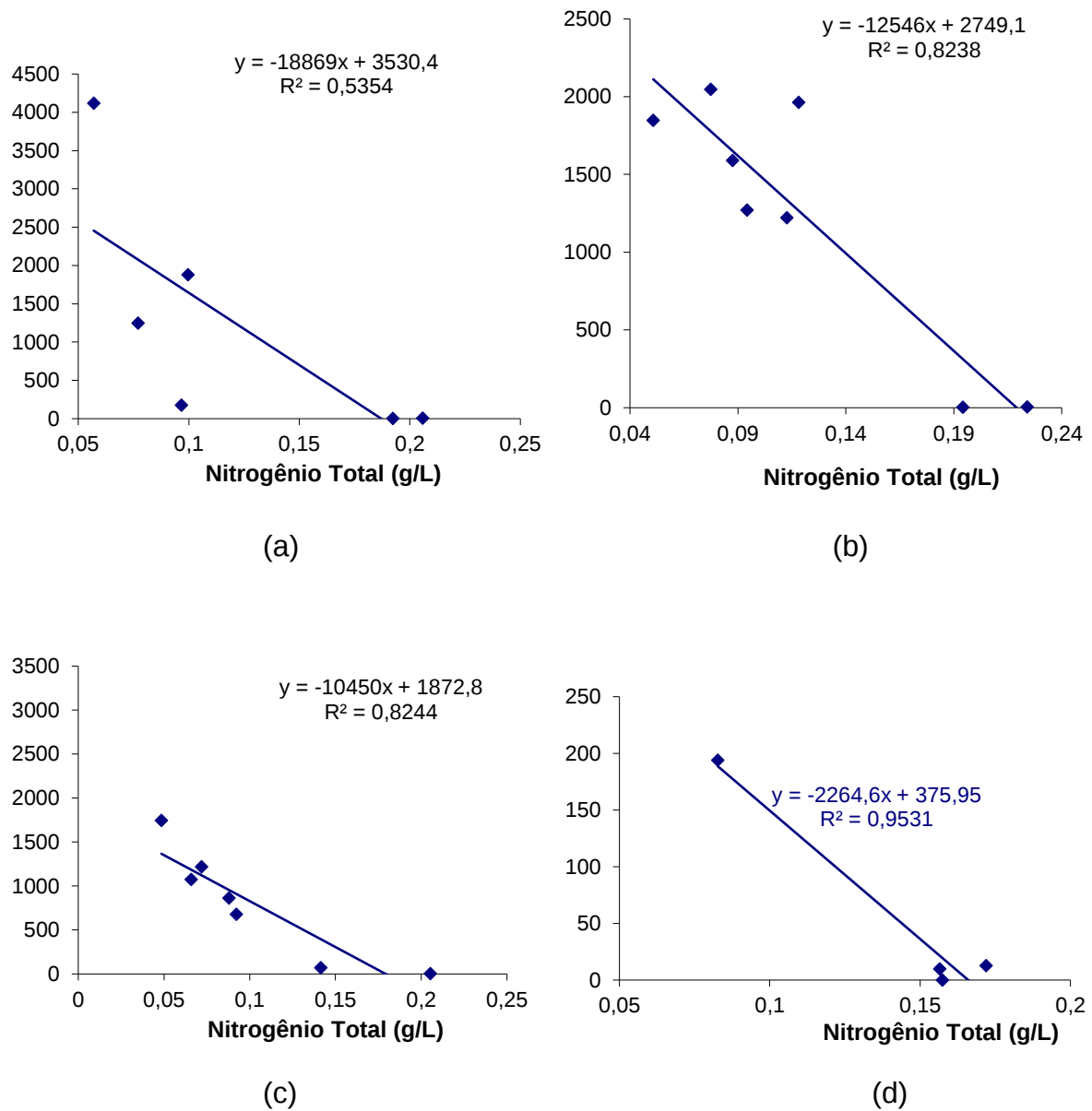


Figura D14 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 1(a), para o Ensaio 2 (b), Ensaio 3 (c) e Ensaio 4 (d), em batelada alimentada.



PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo publicado:

1. URNAU, L.; COLET, R.; SOARES, V.F.; FRANCESCHI, E.; VALDUGA, E.; STEFFENS, C. Extraction of Carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using Ultrasound-Assisted and Chemical Cell Disruption Methods. The Canadian journal of chemical engineering, v. 96, p.1377-1381, 2018.

Artigo submetido à publicação:

1. URNAU, L.; COLET, R.; REATO, P.T.; BALDUS, F.; BURKERT, J.F.M.; STEFFENS, C.; RODRIGUES, E.; JACQUES, R.A.; VALDUGA, E. Use of agro industrial by-products as substrate to obtain carotenoids from *Phaffia rhodozyma* in bioreactor.

Trabalhos completos publicados em anais de congresso:

1. URNAU, L.; COLET, R. ; REATO, P. T. ; BALDUS, F. ; GAYESKI, L. ; BURKERT, J. F. M. ; VALDUGA, E. ; STEFFENS, C. . Estudo Cinético da Bioprodução de carotenoides por *Phaffia rhodozyma* em biorreator batelada simples. In: SIIC- XXIII Seminário Institucional de Iniciação Científica, XXI Seminário de Integração de Pesquisa e Pós Graduação e XV Seminário de Extensão, 2017, Erechim. Anais ACTA, 2017.
2. REATO, P. T.; STEFFENS, C. ; VALDUGA, E. ; BALDUS, F. ; URNAU, L. ; GAYESKI, L. . Maximização da bioprodução de carotenoides em biorreator através do controle da aeração e agitação. In: III CONIGTI- Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2017, Erechim. III CONIGTI- Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2017.
3. URNAU, L.; REATO, P. T. ; STEFFENS, C. ; VALDUGA, E. ; BALDUS, F. ; BURKERT, J. F. M. ; GAYESKI, L. ; COLET, R. . Cinética de produção de carotenoides de *Phaffia rhodozyma* Y-17268 em biorreator batelada simples. In: III CONIGTI- Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2017, Erechim. III CONIGTI- Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2017.
4. URNAU, L.; COLET, R. ; GAYESKI, L. ; REATO, P. T. ; BURKERT, J. F. M. ; STEFFENS, C. ; VALDUGA, E. . Otimização da bioprodução de carotenoides de *Phaffia rhodozyma* Y-17268 utilizando resíduos agroindustriais em frascos agitados. In: II CoNIGT- Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação e II CSBEA- Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2016, Erechim. II CONIGT e III CSBEA, 2016.

5. REATO, P. T. ; URNAU, L. ; GAYESKI, L. ; BALDUS, F. ; COLET, R. ; STEFFENS, C. ; VALDUGA, E. ; BURKERT, J. F. M. . Efeitos da agitação e da aeração na produção de carotenoides por *Phaffia rhodozyma* Y-17268 em biorreator. In: II CONIGT- Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação e III CSBEA- Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2016, Erechim. II CONIGT e III CSBEA, 2016.