

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

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES EM MEIO SINTÉTICO POR
***Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 EM BIORREATOR**

PIHETRA OLIVEIRA TATSCH

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

ERECHIM, RS - BRASIL

FEVEREIRO DE 2008

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES EM MEIO SINTÉTICO POR
***Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 EM BIORREATOR**

Pihetra Oliveira Tatsch

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

Comissão Julgadora:

Prof. Eunice Valduga, D.Sc.
Orientadora

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.
Orientador

Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc.

Prof. Débora de Oliveira, D.Sc.

Erechim, 20 de fevereiro de 2008.

Ao meu noivo Juliano pelo amor, carinho, paciência e compreensão, encorajando-me em todos os momentos.

Aos meus pais João e Helma pelo amor, apoio e estímulo, dando-me força para vencer mais esta etapa de minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

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

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

Aos colegas de trabalho João, Lídia e Cricheli pela ajuda em todos os momentos, tornando o trabalho de pesquisa mais agradável e divertido.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, André, Francieli, Daniela, Elisandra, Roger, Elisângela, Morgana, Renata, Elisângele, Gabriela, Giovanni, Aline e Cilda pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

A minha amiga Adriana pelos conselhos, força e pela amizade em mais esta etapa de estudo e convivência.

Aos meus irmãos Grégor e Pâmela que sempre tiveram uma palavra de carinho e estímulo nos momentos de fraqueza e dificuldades.

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

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos, e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.”

Augusto Cury

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

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES EM MEIO SINTÉTICO POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 EM BIORREATOR

Pihetra Oliveira Tatsch

Fevereiro/2008

Orientadores: Eunice Valduga

Marco Di Luccio

Os carotenóides são corantes naturais sintetizados por plantas, algas e microrganismos. Estes são pigmentos de grande utilização industrial e têm despertado interesse devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos. A bioprodução de corantes é influenciada pelas condições de cultivo, tais como: temperatura, pH, composição do meio, agitação e aeração. Além disso, a quantidade e o perfil dos carotenóides produzidos podem ser estimulados. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de cultivo para a bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) em biorreator, utilizando meio sintético à base de glicose, peptona e extrato de malte. As fermentações foram realizadas em biorreator Biostat com 1 L de volume útil, sem iluminação, durante 100 h com composição do meio de cultivo (concentração de glicose, extrato de malte e peptona), temperatura, pH, agitação e aeração determinados conforme planejamento experimental tipo Plackett-Burman, seguido de planejamento fatorial completo 2^3 , para a maximização da bioprodução. Após a fermentação, realizou-se a recuperação dos carotenóides empregando nitrogênio líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular, e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). A determinação dos carotenóides totais foi realizada espectrofotometricamente ($\lambda = 448$ nm). A concentração

máxima de carotenóides totais obtida no biorreator foi de 3318,6 $\mu\text{g/L}$ nas condições de 25 °C, pH inicial 4,0, 180 rpm, taxa de aeração de 1,5 vvm, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte. A partir dos dados da cinética de fermentação verificou-se que a concentração máxima de carotenóides totais (3425,9 $\mu\text{g/L}$) é atingida em aproximadamente 90 h do início do processo fermentativo. A produção de carotenóides é parcialmente associada ao crescimento celular. Através dos fatores de conversão $Y_{X/N}$ (6,3 g/g) e $Y_{X/S}$ (0,15 g/g), observou-se que o consumo de nitrogênio foi superior ao consumo de glicose. O fator de conversão de células em produto ($Y_{P/X}$) foi de 238 $\mu\text{g/g}$ de carotenóides/g de células, o fator de conversão $Y_{P/N}$ foi de 1516,1 $\mu\text{g/g}$, enquanto que o fator $Y_{P/S}$ foi de 41,3 $\mu\text{g/g}$. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *S. salmonicolor* em biorreator foi de 0,051 h^{-1} . A maior produtividade em células foi 0,19 g/L.h e em carotenóides 56,9 $\mu\text{g/L.h}$.

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

CAROTENOIDS PRODUCTION IN SYNTHETIC MEDIUM BY
***Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 IN BIOREACTOR**

Pihetra Oliveira Tatsch

Fevereiro/2008

Advisors: Eunice Valduga

Marco Di Luccio

Carotenoids are natural dyes biosynthesized by plants, algae and microorganisms. They are pigment highly used in industry and have drawn attention due to the concern with chemical additives used in food. The cultivation conditions such as temperature, pH, medium composition, agitation and aeration influence the dyes bioproduction. Moreover, the carotenoid amount and profile can be enhanced. Thus, the aim of this work was the assessment of cultivation conditions of production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in bioreactor, using synthetic medium based on glucose, peptone and malt extract. Fermentations were carried out for 100 h without illumination, in a Biostat bioreactor with 1L of working volume, with culture medium composition (glucose, malt extract and peptone concentration), temperature, pH, agitation and aeration defined by a Plackett-Burman experimental design, followed by a 2³ complete factorial design to maximize the bioproduction. After the fermentation, the carotenoids were recovered using liquid nitrogen combined to dimethylsulfoxide (DMSO) for cell lysis, and the extraction was carried out with a blend of acetone/methanol (7:3, v/v). The carotenoids were determined spectrophotometrically ($\lambda = 448$ nm). In bioreactor the maximum carotenoid concentration was 3318.6 $\mu\text{g/L}$ in the conditions of 25 °C, initial pH 4.0, 180 rpm, aeration rate 1.5 vvm, 80 g/L glucose, 15 g/L peptone and 5 g/L malt extract. Fermentation kinetics showed that

maximum total carotenoids (3425.9 $\mu\text{g/L}$) was reached around 90 h of fermentation. Carotenoid bioproduction was partially associated to cell growth. Through the yield factors $Y_{X/N}$ (6.3 g/g) and $Y_{X/S}$ (0.15 g/g) it is observed that the nitrogen consumption was higher than glucose consumption. The conversion factor of cell in product ($Y_{P/X}$) was 238 μg carotenoids/g cells, the yield factor $Y_{P/N}$ was 1516.1 $\mu\text{g/g}$, whereas the factor $Y_{P/S}$ was 41.3 $\mu\text{g/g}$. The maximum specific growth rate (μ_{max}) was 0.051 h^{-1} . The highest productivity for cells was 0.19 g/L.h and for carotenoids 56.9 $\mu\text{g/L.h}$.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Considerações gerais sobre a produção de carotenóides.....	18
2.2 Propriedades e funções dos carotenóides	18
2.3 Estrutura e Biossíntese dos Carotenóides.....	20
2.4 Microrganismos produtores de carotenóides.....	24
2.5 Fatores que exercem influência na produção de carotenóides.....	27
2.5.1 Efeito da composição do meio de cultivo.....	28
2.5.2 Efeito do pH.....	30
2.5.3 Efeito da temperatura.....	32
2.5.4 Efeito da luminosidade	34
2.5.5 Efeito da taxa de aeração e agitação.....	34
2.6 Extração e recuperação de carotenóides.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Microrganismo e Meios de Cultura.....	37
3.2 Condições de cultivo	37
3.3 Recuperação dos Carotenóides Totais.....	39
3.4 Determinação dos Carotenóides Totais.....	40
3.5 Determinação dos Carotenóides Específicos.....	40
3.6 Determinações Analíticas	40
3.6.1 Determinação da massa de células	40
3.6.2 Determinação de pH.....	41
3.6.3 Determinação de glicose.....	41
3.6.4 Determinação de nitrogênio	41
3.7 Delineamento Experimental	42

3.7.1 Análise estatística.....	43
3.8 Cinética do processo fermentativo e parâmetros estequiométricas	43
3.8.1 Velocidades instantâneas e específicas.....	43
3.8.2 Fatores de conversão	44
3.8.3 Produtividade	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Crescimento celular.....	46
4.2 Bioprodução de carotenóides.....	48
4.2.1 <i>Screening</i> de variáveis para a bioprodução.....	48
4.2.2 Maximização da bioprodução	56
4.2.3 Cinética do processo fermentativo e parâmetros estequiométricos.....	72
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	80
5.1 Conclusões.....	80
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	81
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXO.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma resumido dos estágios da biossíntese de carotenóides (SILVA, 2004).	20
Figura 2 Estrutura dos carotenóides: (a) Xantofilas - zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina, respectivamente; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).	21
Figura 3 Estágios intermediários da biossíntese de carotenóides (SILVA, 2004).	22
Figura 4 Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados (SILVA, 2004).	23
Figura 5 Formação de xantofilas a partir do carotenóide α -caroteno (SILVA, 2004).	23
Figura 6 Formação de xantofilas a partir de β -caroteno (SILVA, 2004).	24
Figura 7 Inóculo após 48 h de cultivo, a 180 rpm mantido a 25 °C	38
Figura 8 Bioprodução em biorreator Biostat, 1 L, durante 100 h sem iluminação	38
Figura 9 Maceração das células de <i>S. salmonicolor</i> com nitrogênio líquido	39
Figura 10 Carotenóides após solubilização em metanol	40
Figura 11 Características morfológicas macroscópicas da linhagem <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) cultivada em meio de cultura YMA, com 48 h de crescimento.	46
Figura 12 Crescimento celular (a) e curva linearizada (b) da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636), durante 100 h de bioprodução nas condições: 410 rpm, 1,5 vvm, pH 4,0, 30 °C, 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona	47
Figura 13 Comportamento do pH e oxigênio dissolvido durante 100 h de bioprodução nas condições 410 rpm, 1,5 vvm, pH 4,0, 30 °C, 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona.	47
Figura 14 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$)	51
Figura 15 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a concentração específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)	53
Figura 16 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para crescimento celular (g/L)	54
Figura 17 Aspecto visual dos carotenóides dos ensaios 6, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial completo 2^3 .	57
Figura 18 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^3 , para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$)	59

Figura 19 Superfícies de resposta e curvas de contorno para carotenóides específicos ($\mu\text{g/g}$) em função da concentração de peptona e aeração (a), concentração de glicose e aeração (b) e concentração de glicose e concentração de peptona (c).....	63
Figura 20 Superfície de resposta e curva de contorno para glicose consumida (g/L) em função da concentração de glicose e peptona	71
Figura 21 Cinética da bioprodução de carotenóides por <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) para as condições maximizadas (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte) (a) geral (b) detalhe	72
Figura 22 Aspecto visual dos pigmentos extraídos a cada 10 h de biorreação na cinética de produção de carotenóides nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 100 h de bioprodução	73
Figura 23 Produção de carotenóides com o crescimento celular no ponto maximizado do planejamento completo 2^3 em biorreator durante 100 h de cultivo nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte....	74
Figura 24 Produtividade em carotenóides ao longo da bioprodução no ponto maximizado do planejamento completo 2^3 em biorreator durante 100 h de biorreação nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte....	75
Figura 25 Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em células (P_x) durante 100 h de biorreação nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte.....	76
Figura 26 Linearização do crescimento celular da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).....	89
Figura 27 Linearização da produção de carotenóides pela levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).....	89
Figura 28 Determinação das fases de cultivo para a determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).....	90
Figura 29 Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).....	90

Figura 30 Determinação das fases de biorreação para a determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	91
Figura 31 Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	91
Figura 32 Determinação das fases de biorreação para a determinação do fator de conversão $Y_{P/X}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	92
Figura 33 Determinação do fator de conversão $Y_{P/X}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	92
Figura 34 Determinação das fases de cultivo para a determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	93
Figura 35 Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	93
Figura 36 Determinação das fases de biorreação para a determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	94
Figura 37 Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Microrganismos e carotenóides produzidos biotecnologicamente.....	26
Tabela 2 Variáveis e níveis testados no planejamento experimental tipo Plackett-Burman....	42
Tabela 3 Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial completo 2^3	42
Tabela 4 Matriz do planejamento Plackett-Burman (valores reais e codificados) e respostas carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$), carotenóides específicos ($\mu\text{g/g}$), células (g/L) e pH final em 100 h de bioprodução	49
Tabela 5 Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$), produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e concentração de células (g/L) para a bioprodução de 100 h nas condições fixas: pH 4,0, temperatura de 25 °C, 180 rpm e concentração de extrato de malte de 5 g/L	56
Tabela 6 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo 2^3 para carotenóides específicos	61
Tabela 7 Análise de variância para os carotenóides específicos do planejamento fatorial completo 2^3	61
Tabela 8 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial completo 2^3 para concentração de células.....	65
Tabela 9 Análise de variância do planejamento completo 2^3 para a concentração de células .	65
Tabela 10 Matriz do planejamento experimental completo 2^3 (valores reais e codificados) com as respostas pH final, glicose e nitrogênio consumidos.....	67
Tabela 11 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial completo 2^3 para nitrogênio consumido.....	68
Tabela 12 Análise de variância para nitrogênio residual do planejamento fatorial completo 2^3	69
Tabela 13 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo 2^3 , para glicose consumida (g/L)	69
Tabela 14 Análise de variância para a glicose residual do planejamento fatorial completo 2^3	70
Tabela 15 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em meio sintético para o ponto maximizado no planejamento fatorial completo 2^3 nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte, 100 h de biorreação	77

1 INTRODUÇÃO

Os carotenóides são corantes naturais responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração. Além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitâmica A, e as suas propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata) (NIIZU, 2003).

Em formulações comerciais, os carotenóides utilizados podem ser de dois tipos: extratos naturais e corantes sintéticos idênticos aos naturais. A grande demanda gerada pelas indústrias e a crescente procura por produtos naturais, têm resultado em um aumento nas pesquisas referentes à produção de carotenóides via fermentativa. Além da conotação “natural”, os produtos obtidos por produção microbiana podem ser obtidos em curto prazo, em qualquer época do ano.

Muitos microrganismos produzem carotenóides, porém nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se pelo seu uso como fonte protéica, capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar. Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade (HAYMAN et al., 1974).

A produção de carotenóides pelo processo biotecnológico tem sido investigada, destacando-se a produção pelas leveduras do gênero *Rhodotorula* (MALISORN & SUNTORNSUK, 2007; LI et al., 2008), *Phaffia rhodozyma* (LIU et al., 2006; VERDOES et al., 2003), *Sporobolomyces* (MALDONADE et al. 2008; BUZZINI et al., 2007), *Blakeslea trispora* (MANTZOURIDOU et al., 2002; LÓPEZ-NIETO et al., 2004) e *Haematococcus pluvialis* (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA et al., 2004; LÓPEZ et al., 2006). Dentre os carotenóides naturais mais estudados destacam-se a astaxantina, β -caroteno, toruleno e licopeno.

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

merecem atenção, como a luminosidade (GARBAYO et al., 2003), agitação e aeração (LIU et al., 2006) e pH (HU et al., 2006).

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

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a bioprodução de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) em biorreator. Assim, foram analisadas as condições de cultura, tais como: composição do meio de cultivo (concentrações de glicose, peptona e extrato de malte), pH inicial do meio, temperatura, velocidade de agitação e taxa de aeração, visando à maximização da produção de carotenóides com meio sintético em biorreator, além da obtenção de parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e da bioprodução de carotenóides.

Primeiramente, o estudo da bioprodução de corantes foi realizado através de um *screening* de variáveis com intuito de identificar quais apresentavam efeito significativo sobre a produção de carotenóides. Na segunda etapa do trabalho, as variáveis que se mostraram significativas foram novamente investigadas com o objetivo de maximizar a bioprodução de corante. Após a obtenção das melhores condições de biorreação para a formação de produto, foram obtidos os parâmetros cinéticos e estequiométricos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este item apresenta informações sobre a bioprodução de carotenóides, abordando definições, propriedades e funções dos carotenóides, aspectos industriais da produção, microrganismos produtores, fatores que influenciam a biorreação e processos de extração e recuperação destes compostos.

2.1 Considerações gerais sobre a produção de carotenóides

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

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

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

Segundo a CHR Hansen, 38 % do corante utilizado industrialmente é sintético, 32 % é natural e 18 % idêntico ao natural, sendo que o mercado de bebidas não-alcoólicas, alimentos preparados e confeitaria são os líderes no mercado de corantes, totalizando 65 % do consumo.

2.2 Propriedades e funções dos carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho de muitos alimentos, tais como frutas, vegetais, gema de ovo, alguns peixes, como salmão e truta, e crustáceos (MALDONADE et al., 2007).

Além de colorir, os carotenóides possuem atividades biológicas importantes destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (MALDONADE et al. (2007); BHOSALE (2004); AKSU & EREN, (2007)).

Nas indústrias de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corante, com os objetivos de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Mais recentemente, com o crescente interesse pela saúde, os carotenóides também têm sido adicionados aos alimentos devido a suas atividades biológicas, a fim de enriquecer o produto alimentício. São também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS et al., 2000), coloração específica e fotoproteção (MARASCO & SCHMIDT-DANNERT, 2003).

Industrialmente os carotenóides tais como β -caroteno e astaxantina são utilizados como corantes naturais para alimentos ou adicionados em ração para aquicultura (AKSU & EREN, 2007). A astaxantina é um pigmento encontrado em animais aquáticos, tais como lagosta, siri e camarão. Este pigmento protege contra radicais livres, peroxidação lipídica, danos oxidativos ao colesterol LDL, oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados essenciais e proteção contra os efeitos da luz UV, membranas celulares, células e tecidos (HU et al., 2006).

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

Os pigmentos podem absorver luz especificamente na região do ultravioleta (UV) e visível do espectro, o restante é transmitido ou refletido, e apresentam cor. A estrutura responsável pela absorção da luz é o grupamento cromóforo, que nos carotenóides se caracteriza pelas duplas ligações conjugadas. Cada carotenóide é caracterizado por um espectro de absorção eletrônica. Assim, a espectroscopia de absorção é uma importante técnica na análise de carotenóides (GROSS, 1991).

2.3 Estrutura e Biossíntese dos Carotenóides

Os carotenóides são isoprenóides lipofílicos sintetizados por todos os microrganismos fotossintéticos (incluindo plantas, algas e cianobactérias), e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. Duas classes de carotenóides são encontradas na natureza: os carotenos, tais como β -caroteno, hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula; e os derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, denominados xantofilas (BOTELLA-PAVÍA & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006).

A maioria dos carotenóides são tetraterpenóides C_{40} compostos de 8 unidades isoprenóides, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. A estrutura básica acíclica C_{40} pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação, conforme demonstrado na Figura 1. A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (PFANDER, 1987; OLIVIER & PALOU, 2000). A Figura 2 apresenta a estrutura de alguns carotenóides.

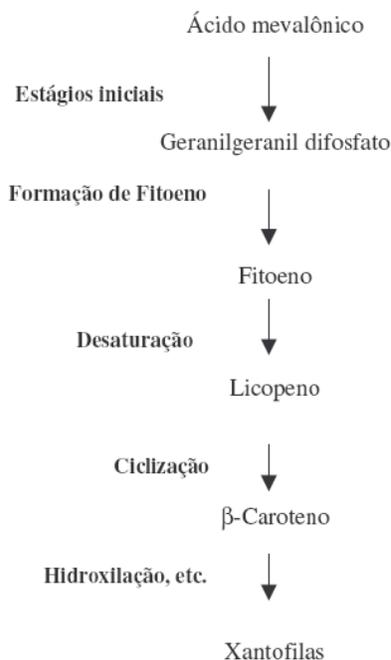


Figura 1 Fluxograma resumido dos estágios da biossíntese de carotenóides (SILVA, 2004).

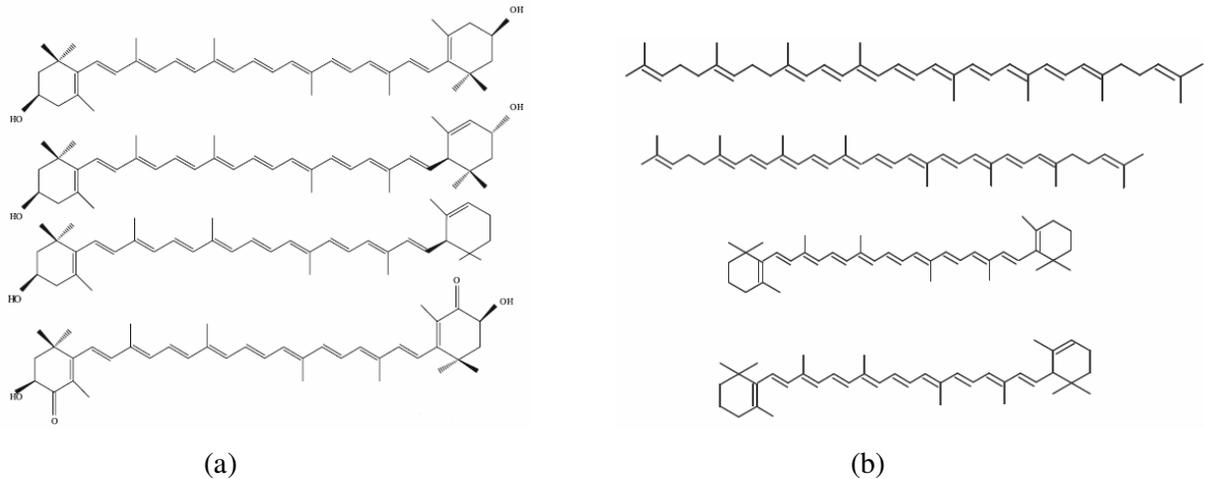


Figura 2 Estrutura dos carotenóides: (a) Xantofilas - zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina, respectivamente; (b) Carotenos – neurosporeno, licopeno, β -caroteno e α -caroteno, respectivamente (SILVA, 2004).

Os carotenóides são tetraterpenos, e sua biossíntese apresenta um padrão para todos os terpenóides. O primeiro precursor específico na biossíntese dos terpenóides é o ácido mevalônico (GOODWIN, 1981). O ácido mevalônico, após uma série de reações, forma geranyl difosfato (10 C), farnesil difosfato (15 C) e geranyl-geranyl difosfato (20 C) (SILVA, 2004).

A dimerização de duas moléculas de geranyl-geranyl difosfato forma o fitoeno, sendo este o primeiro composto de quarenta carbonos, embora ainda sem coloração. Segue-se uma série de desaturações a partir do fitoeno para formar fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno e, finalmente licopeno, conforme demonstrado na Figura 3.

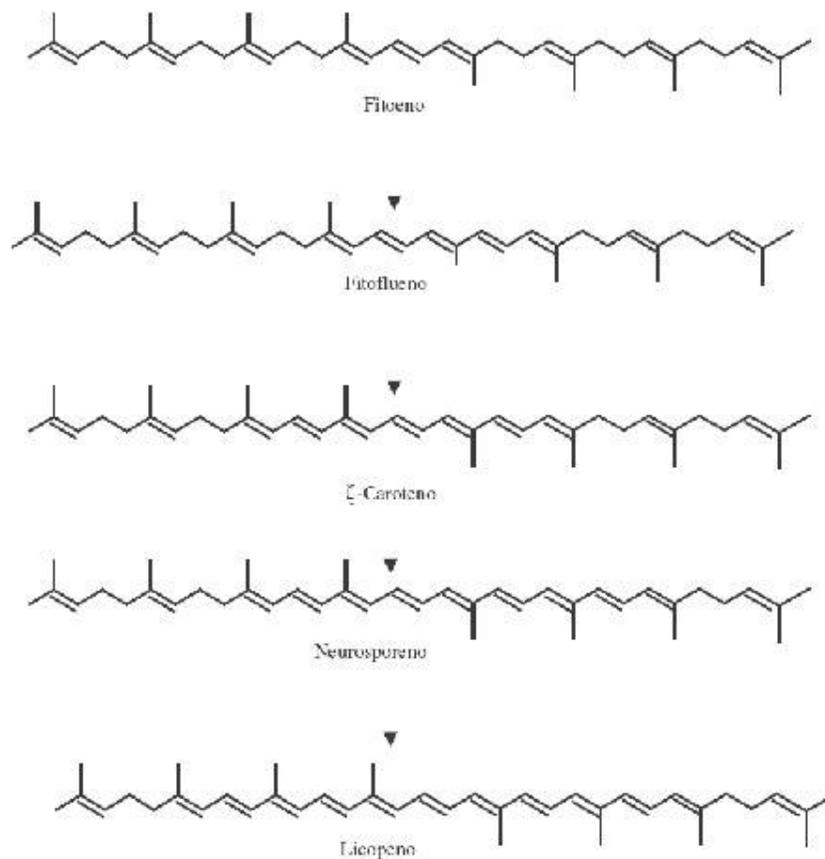


Figura 3 Estágios intermediários da biossíntese de carotenóides (SILVA, 2004).

Segundo Silva (2004), a ciclização pode ocorrer a partir do neurosporeno ou licopeno (Figura 4). O neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel β de β -zeacaroteno ou o anel α de α -caroteno. Estes dois carotenóides são transformados em γ -caroteno e δ -caroteno, respectivamente, pela introdução de uma dupla ligação, estendendo o sistema de dupla ligação conjugadas. O licopeno pode também ser ciclizado em uma das extremidades, gerando γ -caroteno e δ -caroteno. Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em β -caroteno e α -caroteno, respectivamente.

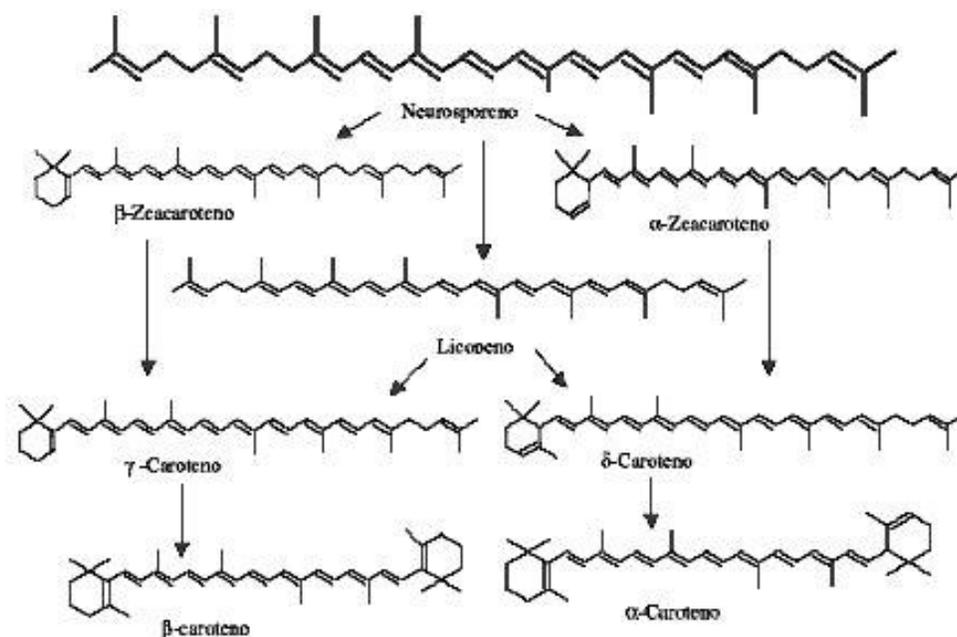


Figura 4 Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados (SILVA, 2004).

Após a formação dos carotenóides cíclicos, tem-se a introdução de substituintes, como a hidroxila, gerando xantofilas. Nas Figuras 5 e 6, tem-se a formação das xantofilas a partir do α -caroteno e β -caroteno, respectivamente.

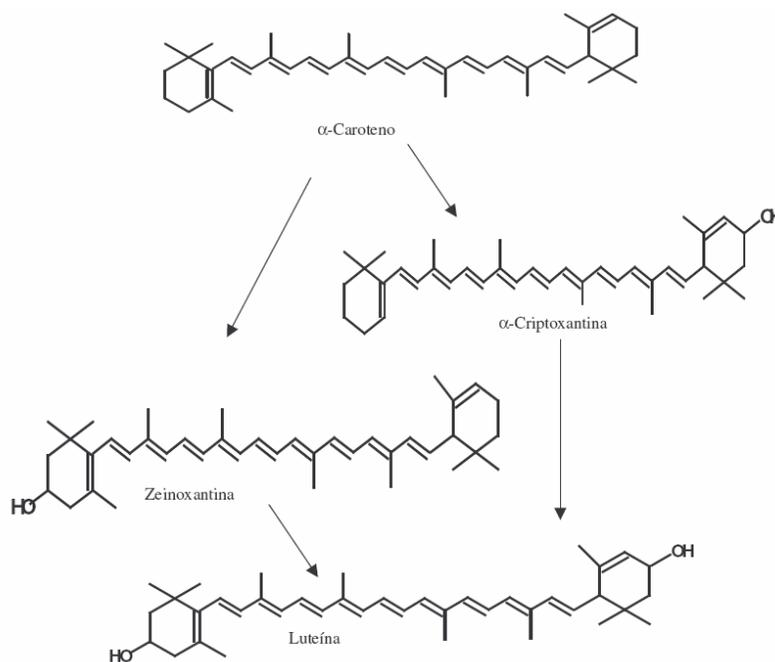


Figura 5 Formação de xantofilas a partir do carotenóide α -caroteno (SILVA, 2004).

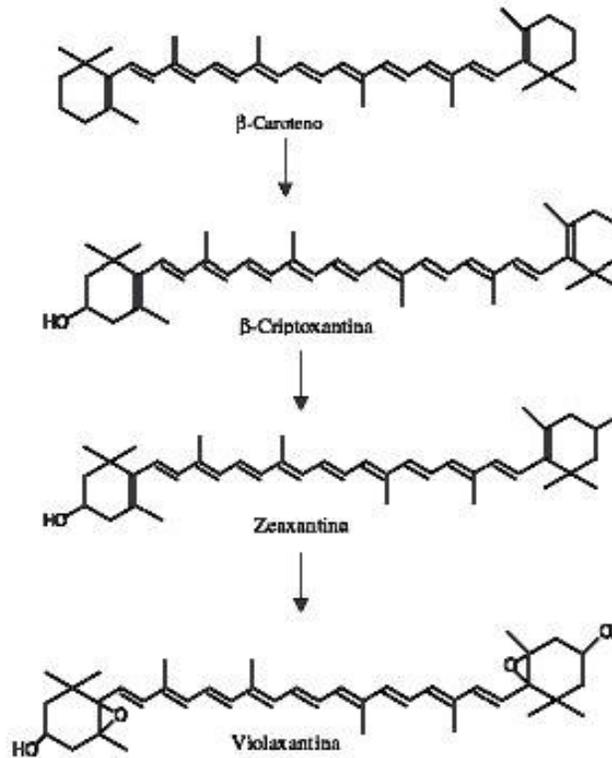


Figura 6 Formação de xantofilas a partir de β -caroteno (SILVA, 2004).

2.4 Microrganismos produtores de carotenóides

Os carotenóides podem ser biossintetizados por microrganismos fotossintetizantes, como por exemplo, algas e cianobactérias (azuis e verdes), e por microrganismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

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

A microalga *Dunaliella* é rica em β -caroteno e outros carotenóides de grande aplicação. A Índia possui a maior indústria produtora desta microalga, onde o β -caroteno destina-se ao uso farmacêutico. Outras grandes produtoras estão localizadas na Austrália, Estados Unidos, China, Mongólia e Japão; pequenas plantas também são encontradas no México, Chile, Cuba, Irã e Taiwan (DUFOSSÉ et al., 2005).

A produção industrial de astaxantina por *Haematococcus* também apresenta grande interesse devido ao elevado valor comercial deste pigmento, e o grande crescimento do mercado da aqüicultura. Os principais produtores mundiais estão localizados nos Estados Unidos, Japão e Índia (DUFOSSÉ et al., 2005).

A capacidade do cultivo de leveduras em meios com alto teor de açúcar, torna estes microrganismos industrialmente interessantes. Leveduras tais como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (FONTANA et al., 1996), *Rhodotorula glutinis* (AKSU & EREN, 2007; TINOI et al., 2005), *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU & EREN, 2005), *Sporobolomyces* (DAVOLI et al., 2004) e *Phaffia* (LIU et al., 2006), estão sendo estudadas com a finalidade de maximização e/ou otimização da bioprodução de carotenóides, visando à utilização industrial.

Na Tabela 1 estão apresentados os microrganismos tecnologicamente interessantes com potencial para ser empregados na bioprodução dos principais carotenóides.

Tabela 1 Microrganismos e carotenóides produzidos biotecnologicamente

Espécies	Carotenóides principais	Autores
Cianobactérias		
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
Algas		
<i>Chlorela pyrenoidosa</i>	Luteína	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno	Aguilar et al. (2004)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	β -caroteno	Fazeli et al. (2006)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Orosa et al. (2004)
<i>Sporiococcum excetricum</i>	Luteína	Johnson & Schroeder (1995)
Fungos e leveduras		
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e β -caroteno	Liu et al. (2006); Parajó et al. (1998)
<i>Rhodospiridium sp</i>	Toruleno, β -caroteno	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularrodina, β -caroteno, toruleno	Buzzini & Martini (1999)
<i>Rhodotorula graminis</i>	Toruleno	Buzzini et al. (2005)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Toruleno, torularrodina e β -caroteno	Buzzini & Martini (1999)
<i>Rhodotorula rubra</i>	β -caroteno	Shih & Hang (1996)
<i>Rhodotorula spp</i>	Toruleno, torularrodina e β -caroteno	Bhosale & Grade (2001)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	β -caroteno	Valduga (2005)
<i>Sporidiobolus sp</i>	Toruleno, torularrodina, β -caroteno	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularrodina, β -caroteno, toruleno	Davoli et al. (2004)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Torularrodina, β -caroteno,	Razavi & March (2006)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Hu et al. (2006)
Bactérias		
<i>Mycobacterium breviciae</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas	Johnson & Schroeder (1995)

2.5 Fatores que exercem influência na produção de carotenóides

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

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

Segundo Bhosale (2004), pode-se alcançar uma melhor produção de carotenóides com um custo efetivo, utilizando estimulantes no meio e ajustando as condições externas do cultivo. Silva (2004) estudou os efeitos de vários agentes químicos (ácido acético, β -ionona, ácido mevalônico, difenilamina e outros aminoácidos) na biossíntese de carotenóides por leveduras do gênero *Rhodotorula*, a fim de aumentar e dirigir a carotenogênese. O ácido acético não apresentou influência no crescimento e na produção de pigmento, porém a β -ionona inibiu o crescimento e a carotenogênese. O ácido mevalônico estimulou a formação de carotenóides em 120 % para *R. mucilaginosa* e 35 % para *R. glutinis*, sem afetar a produção de células.

O efeito de traços de metais no crescimento de *R. graminis* foi analisado por Buzzini et al. (2005), onde se observou uma influência seletiva no perfil de carotenóides. O efeito observado sobre a biossíntese dos carotenóides específicos nas leveduras vermelhas, pode ser explicado hipotetizando um possível mecanismo de ativação ou inibição causado por determinados íons metais sobre enzimas carotenogênicas específicas.

Os trabalhos que referenciam estudos sobre as condições operacionais da biorreação em biorreator ainda são poucos, e a utilização de leveduras para produção de carotenóides em fermentador ainda encontra-se em fase de pesquisa.

Dentre os trabalhos que utilizam biorreator para a bioprodução, encontra-se o estudo de Park et al. (2007), onde se utilizou um biorreator de 5 L agitado mecanicamente para o cultivo de *R. glutinis*, obtendo torularrodina como carotenóide majoritário, seguido de

toruleno e β -caroteno. García-González et al. (2005) cultivaram a microalga *D. salina* em fotobiorreator tubular fechado de 55 L, com um sistema de air-lift para recirculação de células, onde se observou um aumento na produção de β -caroteno e luteína.. Hu et al. (2006) obtiveram uma concentração máxima de 27,05 mg/L no cultivo de astaxantina por *X. dendrorhous* em fermentador agitado mecanicamente sob pH controlado, com volume de trabalho de 20 L e 3 impelidores de 6 pás cada.

Fang & Wang (2002) realizaram fermentação para produção de astaxantina com *X. dendrorhous* e *Bacillus circulans* em biorreator de 1,5 L. A agitação foi mantida constante a 400 rpm, aeração 3,6 vvm, pH 6,5 e temperatura 30 °C a 34 °C, obtendo-se 96 % do pigmento extraído após 48 h de fermentação em condições ótimas.

Ramírez et al. (2006) analisaram a produção de astaxantina por *P. rhodozyma* em batelada alimentada em biorreator de 3 L, 20 °C, pH 6,0, 900 rpm e vazão de ar de 1,5 L/min. A cada mudança de pH (de ácido para alcalino) causada pela atividade metabólica das leveduras, o sistema de alimentação era ativado. As fontes de carbono e nitrogênio foram mantidas entre 15 g/L e 25 g/L, e 0,5 g/L e 1,0 g/L, respectivamente. A vazão de ar foi elevada 0,2 L/min a cada 12 h até atingir 2,6 L/min. A suplementação de nutrientes adequada incrementou a formação de astaxantina e biomassa. A máxima produção de astaxantina alcançou 23,81 mg/L, enquanto que a formação de biomassa foi 39 g/L.

2.5.1 Efeito da composição do meio de cultivo

A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenóides. De acordo com Buzzini & Martini (1999), o uso de glicose leva a maiores rendimentos na produção específica de carotenóides (1000 μ g/g) por *Rhodotorula* sp. 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*. Yamane et al. (1997) observaram que houve um aumento de até 12 vezes na produção de β -caroteno quando *P. rhodozyma* cresceu em meio com 5 % (m/v) de açúcar.

Tinoi et al. (2005) demonstraram a eficiência da utilização de farinha hidrolisada de resíduo de feijão e extrato de batata-doce como principais fontes de nitrogênio e carbono, na bioprodução de carotenóides por *R. glutinis*. Nas condições otimizadas pelo método simplex, obteve-se 3,48 mg/L de carotenóides totais e 10,35 g/L de biomassa, representando

incremento de 43 % e 20 % quando comparados a variação de um único fator, respectivamente.

A levedura *S. ruberrimus* H110 foi cultivada por Razavi & March (2006) em diferentes fontes de carbono: glicerol puro, glicerol comercial e glicose. O glicerol comercial propiciou a concentração máxima de carotenóides de 3,84 mg/g, onde se observou a torularrodina (3,7 mg/g) como carotenóide majoritário, seguida de β -caroteno (0,14 mg/g). Em estudo realizado por Davoli et al. (2004) com a levedura *S. roseus* cultivada em meio YED (30 g/L de glicose, 4 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4 e 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tendo glicose como fonte de carbono, obteve-se uma concentração máxima de carotenóides de 412 $\mu\text{g/g}$, sendo que os carotenóides majoritários foram o toruleno e β -caroteno.

Valduga (2005) cultivando a levedura *S. salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados, verificou que o teor de carotenóides totais e a produção específica aumentaram com a elevação das concentrações de glicose, extrato de malte e peptona, obtendo o teor máximo de carotenóides totais de 1019 $\mu\text{g/L}$ no ensaio com 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona.

A salinidade também é um fator que provoca alterações na produção de carotenóides. Tal fato pode ser observado no trabalho de Aguilar et al. (2004), onde duas cepas de *D. salina* foram cultivadas em meios com diferentes salinidades, o meio Johnson foi modificado com a adição de 15 % e 23 % de NaCl, enquanto que o meio Provasoli com 12,5 % e 20 % de NaCl. A densidade celular máxima foi obtida no meio Johnson a 15 % de NaCl em ambas as cepas. Para carotenóides totais, os valores mais altos foram obtidos no meio Provasoli com 20 % NaCl (13,3 mg/L), e carotenóides específicos 110,9 pg/cel.

Em frascos agitados, *R. glutinis* DM28 foi cultivada em salmoura de rabanete em várias concentrações, nas quantidades mais baixas de sólidos solúveis totais (10 a 30 g/L), a levedura cresceu bem e consumiu todo o substrato no final de 24 h. Contudo, a 50 g/L a levedura cresceria continuamente até o final do cultivo (72 h) se houvesse substrato disponível na salmoura. A 70 g/L o microrganismo não pôde crescer devido à alta concentração salina e outros componentes químicos (MALISORN & SUNTORNSUK, 2007).

Fazeli et al. (2006) examinaram o efeito de diferentes concentrações salinas (0,05 a 3 M NaCl) sobre a cinética de crescimento, carotenóides totais e β -caroteno acumulados na microalga *D. tertiolecta*. A maior quantidade de carotenóides detectada (11,7 mg/L) foi em salinidade de 0,5 M NaCl durante a fase estacionária de crescimento, porém nas maiores concentrações salinas (3 M NaCl) obteve-se maior produção de carotenóides específicos

(2,0 pg/cel). Como na salinidade 0,5 M obteve-se 32 % de 9-cis- β -caroteno na fase exponencial, e 23 % de β -caroteno na fase estacionária, sugere-se que o acúmulo de carotenóides e também as proporções dos isômeros β -caroteno não foram afetados somente pela salinidade, mas também pelas fases de crescimento da cultura.

Shih & Hang (1996) avaliaram o potencial de utilização da salmoura como substrato para a produção de carotenóides com três cepas de *R. rubra*. O resíduo é gerado pela indústria de fermentação de pickles, apresentando uma alta demanda bioquímica, alta acidez e alta concentração de NaCl. A cepa *R. rubra* NRRL Y-15596 apresentou a maior quantidade de carotenóides totais, expressos como 1041 $\mu\text{g/L}$ de β -caroteno. A levedura removeu completamente a acidez, e reduziu em 70 % a demanda bioquímica de oxigênio, demonstrando que esta fermentação pode apresentar valor econômico no tratamento de subprodutos.

Buzzini & Martini (1999) utilizaram como substratos o mosto de uva, xarope de glicose, melão de beterraba, extrato de farinha de soja e extrato de farinha de milho, na bioprodução de carotenóides por cepas gênero *Rhodotorula*. O rendimento máximo de carotenóides totais (5,9 mg/L) e carotenóides específicos (630 $\mu\text{g/g}$) foi obtido para a cepa *R. glutinis* cultivada em mosto de uva concentrado.

A produção de carotenóides por *R. glutinis* utilizando substratos de baixo custo (glicose, sacarose de melão e lactose do soro de queijo) também foi estudada por Aksu & Eren (2007). A maior concentração de carotenóides totais (125 mg/L) foi obtida com 20 g/L de sacarose de melão; enquanto que, o maior rendimento de produto baseado na máxima concentração celular (35,5 mg/g) foi alcançado com a lactose do soro na concentração de 13,2 g/L. Os resultados comprovaram que a *R. glutinis* é um microrganismo promissor para a utilização industrial.

2.5.2 Efeito do pH

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

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Desta forma o pH inicial é objeto de estudo na

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

Johnson & Gil-Hwan (1991) verificaram que as condições ótimas para a produção de carotenóides não são as mesmas que para o crescimento celular. O pH inicial ótimo de crescimento para *P. rhodozyma* foi de 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina foi a pH 5,0.

O efeito do pH inicial na concentração de carotenóides e biomassa de *S. salmonicolor* em frascos agitados também foi avaliado por Valduga (2005). Verificou-se que o melhor pH de crescimento encontra-se entre 4,0 e 5,0, enquanto que a máxima produção de carotenóides dá-se em pH 4,0.

Em estudo realizado por Ramírez et al. (2001), foi observado no *screening* de variáveis com meio Yuca (2 g/L de KH_2PO_4 ; 0,5 g/L de Mg SO_4 ; suplementado com suco de tâmara e uréia), que o pH foi um dos parâmetros de maior efeito na produção de pigmento por *P. rhodozyma*, bem como a interação entre pH e temperatura. As menores concentrações de pigmento foram obtidas com os valores mais baixos de pH (4,0) e temperatura (16 °C); enquanto que com pH mais elevado (6,0) na mesma temperatura de 16 °C observou-se aumento na síntese de corante. Com temperaturas elevadas (22 °C), a variável pH não apresentou efeito. Nos experimentos realizados com meio YM ocorreram diferenças em relação ao efeito do pH. Em pH 4,0 diminuiu-se drasticamente a concentração celular e a produção de astaxantina, independentemente da temperatura. A menor síntese de pigmentos foi observada no menor valor de pH (4,0) e inóculo (5 %), enquanto que em pH 6,0 a porcentagem de inóculo não apresentou efeito.

O valor de pH do meio de cultivo não influenciou somente a atividade biossintética da levedura *R. mucilaginosa* em estudo realizado por Aksu & Eren (2005), mas também a taxa de crescimento da cultura. Com a elevação do pH de 3,0 a 7,0 observou-se aumento nas taxas de crescimento e produção de carotenóides, com decréscimo em maiores valores de pH. Em outro caso, a levedura *R. glutinis* estudada por Tinoi et al. (2005) apresentou um pH ótimo para o crescimento de 5,91, confirmando a preferência geral das leveduras por pH levemente ácido.

Shih & Hang (1996) observaram que em pH baixos, na faixa de 3,4 a 4,5, ocorreu inibição do crescimento celular e da produção de carotenóides por *R. rubra*, sendo que a máxima concentração celular e produção foram obtidas em pH inicial de 5,0.

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

2.5.3 Efeito da temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos microrganismos, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese. Segundo Hayman et al. (1974), a temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenóides, e mudanças na concentração enzimática definitivamente controlam o nível de carotenóides nos microrganismos.

Frengova et al. (1995) verificaram que a concentração relativa de cada carotenóide foi alterada pela temperatura de fermentação. Quando *R. glutinis* foi cultivada em 5 °C, ocorreu a produção predominante de β -caroteno, enquanto que o cultivo a 25 °C levou à síntese de toruleno e torularrodina. O crescimento celular ótimo foi obtido a 30 °C. Nesta mesma temperatura, a máxima produção de carotenóides foi de 8388 μ g/L e 31,9 g/L de biomassa.

O efeito de três níveis de temperatura foi estudado por Aksu & Eren (2005), sobre o crescimento e produtividade de carotenóides na levedura *R. mucilaginosa*. Com a elevação da temperatura de 25 °C para 30 °C ocorreu aumento nas taxas de formação de carotenóides e crescimento específico, sendo que estas diminuíram bruscamente acima de 30 °C. Tal

comportamento deu-se devido à desnaturação do sistema enzimático do microrganismo exposto à alta temperatura. Assim, para *R. mucilaginosa* a temperatura ótima de cultivo foi de 30 °C com uma produção de 69,8 mg/L de carotenóides e 5,1 g/L de biomassa.

Em outra investigação, Aksu & Eren (2007) estudando a produção de carotenóides com *R. glutinis*, obtiveram comportamento semelhante ao da *R. mucilaginosa*. A taxa de crescimento específico da levedura aumentou com a elevação da temperatura de 25 °C para 30 °C e, diminuiu de maneira drástica em temperatura superior. A taxa de formação de carotenóides também foi influenciada pelo aumento da temperatura, onde até 30 °C foi observado um crescimento rigoroso na concentração de carotenóides totais, e acima desta temperatura ocorreu um leve crescimento.

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

Valduga (2005) testou o cultivo de *S. salmonicolor* CBS 2636 em três temperaturas distintas: 20 °C, 28 °C e 35 °C, observando efeito negativo da temperatura sobre produção de carotenóides totais e específicos.

O estudo da influência da temperatura sobre o crescimento celular e produção de carotenóides da levedura *S. ruberrimus* foi analisado por Razavi & March (2006), sendo observado o crescimento na produção celular enquanto manteve-se a temperatura entre 19 °C e 27 °C. Em temperatura superior a 27 °C ocorreu crescimento celular, porém as células não apresentaram coloração. A produção dos carotenóides ocorreu rapidamente durante a fase exponencial na maioria das temperaturas, com exceção a 31 °C. A temperatura ótima de bioprodução foi de 19 °C, onde a torularrodina foi sintetizada em quantidade superior ao β -caroteno, 120 mg/L e 5 mg/L, respectivamente.

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

2.5.4 Efeito da luminosidade

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

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

Em estudo realizado visando a otimização da produção de astaxantina e células por *H. pluvialis*, o crescimento foi avaliado sob duas densidades de fluxo de fótons (35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ e 85 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). A carotenogênese foi induzida por uma densidade luminosa de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. O conteúdo de carotenóides cultivados em nitrato a 35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ e sujeito a alta luminosidade (150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) aumentou de 1,7 para 4,8 mg/L (GONZÁLEZ et al., 2003).

Johnson et al. (1979) revelaram que a intensidade luminosa não influenciou a pigmentação das células de *P. rhodozyma*. Estudos realizados por Gil-Hwan & Johnson (1990), utilizando alta intensidade luminosa mostraram que a luz inibiu o crescimento celular e a formação de pigmento, houve produção de β -zeacaroteno, indicando a ocorrência de estresse celular. Vázquez & Santos (1998) verificaram que *P. rhodozyma*, quando cultivada sob iluminação, produziu astaxantina como principal carotenóide. Entretanto, quando esta levedura foi cultivada na ausência de luz, o carotenóide principal encontrado foi o HDCO (3-OH-3',4'-dideidro- β - Ψ -caroteno-4-ona), com concentração acima de 0,75 mg/L.

2.5.5 Efeito da taxa de aeração e agitação

Os microrganismos aeróbicos assim como *P. rhodozyma*, cujo crescimento (metabolismo primário) é dependente do fornecimento de oxigênio, necessitam de definição

das melhores condições de aeração e agitação para maior rendimento. Segundo Yamane et al. (1997), a taxa de produção de astaxantina por *P. rhodozyma* aumenta com a elevação do fornecimento de oxigênio.

Os efeitos da transferência de oxigênio em frascos agitados com *P. rhodozyma* foram estudados por Liu et al. (2006); em relação à taxa de consumo de oxigênio, observou-se que com 30 h de fermentação a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida era próxima de zero, enquanto que na fase gasosa, a concentração de oxigênio diminuiu fracamente nas primeiras 30 h e permaneceu em altas concentrações. Devido ao comportamento observado em ambas as fases definiu-se que esta é a etapa limitante do transporte de oxigênio.

No mesmo trabalho foi evidenciado que o aumento da agitação e a diminuição do volume de líquido ocasionaram elevação no crescimento celular e produção de carotenóides, sendo que a mudança na velocidade de agitação apresentou maior efeito no rendimento de carotenóides nos maiores volumes de líquido. O coeficiente de transferência de oxigênio diminuiu com a redução do volume de líquido e aumentou com a velocidade de agitação.

A influência da aeração sobre o conteúdo de carotenóides das leveduras *S. roseus* e *R. glutinis* foi estudada por Davoli et al. (2004), observando que para *R. glutinis* a maior taxa de aeração (frascos com entalhes) permite obter maior concentração de carotenóides, um aumento de 113 µg/g para 206 µg/g, embora o perfil de carotenóides permaneça inalterado. No entanto para *S. roseus*, o aumento na aeração proporcionou o incremento na concentração de carotenóides de 109 µg/g para 412 µg/g, porém ocorreu mudança no conteúdo dos carotenóides específicos, indicando uma mudança biossintética.

Aksu & Eren (2005) observaram um aumento nas taxas específicas de crescimento e de formação de carotenóides com a elevação das taxas de aeração (0 a 2,4 vvm) para *R. mucilaginosa*, obtendo biomassa de 5,7 g/L, carotenóides totais 112,8 mg/L e rendimento de produto de 19,8 mg/g. Assim, a aeração mostrou-se benéfica para o crescimento celular, devido à melhora nas características de transferência de massa com respeito a substrato, produto e oxigênio. O mesmo comportamento foi observado por Aksu & Eren (2007) com a levedura *R. glutinis*, obtendo-se biomassa de 5,4 g/L, carotenóides totais 105,8 mg/L e rendimento de produto de 19,6 mg/g.

O estudo de agitação em erlenmeyeres realizado por Tinoi et al. (2005) demonstrou que em taxas de agitação baixas (100 a 150 rpm) tem-se menor crescimento celular devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes na superfície das células. Ao contrário, em altas taxas de agitação (>250 rpm), ocorreu ruptura celular evidenciado com o aparecimento de uma fina camada oleosa.

Valduga (2005) realizou um *screening* de variáveis na bioprodução de carotenóides em frascos agitados por *S. salmonicolor* CBS 2636, onde foi observado que a agitação (150 a 200 rpm) exerceu efeito positivo significativo ($p < 0,05$) sobre a concentração de carotenóides totais, carotenóides específicos e biomassa.

2.6 Extração e recuperação de carotenóides

A bioprodução industrial de carotenóides está bem estabelecida e vem se expandindo comercialmente, porém as operações de extração e recuperação do produto contribuem para aumento dos custos da produção. Assim, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados visando estudar a recuperação eficiente dos carotenóides intracelulares (VALDUGA, 2005; SARADA et al., 2006; PARK et al., 2007) e, conseqüentemente contribuindo para a redução de custo com as operações de *downstream*.

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

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

Em função da forte associação dos carotenóides com as células e, no sentido de maximizar a extração dos pigmentos, Valduga (2005) testou 11 métodos diferentes de rompimento celular e extração com solventes. Foi constatado que quando utilizada a combinação nitrogênio líquido e DMSO para ruptura celular e, extração com mistura de acetona e metanol (7:3), obteve-se a maior recuperação de carotenóides da levedura *S. salmonicolor* cultivada em meio YM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo e Meios de Cultura

A produção de carotenóides em biorreator foi realizada com a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). Para a manutenção da cultura utilizou-se meio YMA e, para o preparo do inóculo, meio YM. A seguir tem-se a descrição da composição e preparo dos meios:

a) Meio de manutenção: Meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*) apresentando na composição 3 g/L de extrato de levedura (Vetec), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L peptona (Himedia), 10 g/L de glicose (Nuclear) e 20 g/L de agar (Vetec). Após preparo, o meio foi introduzido em tubos de ensaio com rosca e esterilizado a 121 °C durante 15 min em autoclave (Phoenix, modelo AV75). Após esterilização, o meio foi inclinado em bancada até completo resfriamento.

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

3.2 Condições de cultivo

Inicialmente, a cultura liofilizada de *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) foi hidratada em meio YM em estufa (Tecnal, modelo TE 393/2), a 25 °C por 72 h. Posteriormente, a cultura foi transferida para tubos inclinados contendo meio YMA, e incubada por 48 h a 25 °C. Após o crescimento, os tubos foram conservados a 4 °C em refrigerador (Brastemp). A cada 2 meses foram realizadas repicagens dos microrganismos.

Para o preparo do inóculo, uma alçada de células da cultura estoque foi transferida para erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM. Após inoculação, o frasco foi coberto com papel alumínio e incubado a 25 °C, 180 rpm por aproximadamente 48 h em agitador orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB) até absorvância ($\lambda=650$ nm) próxima de 0,7, conforme observado na Figura 7.

A fim de verificar as características macroscópicas das colônias, após 48 h de crescimento do inóculo, realizou-se o plaqueamento da cultura em meio YMA. Além disso, o comportamento do microrganismo no biorreator foi avaliado através da construção da curva de crescimento durante 100 h de produção sem iluminação, nas condições 410 rpm, 1,5 vvm,

pH 4,0, 30 °C, 40 g/L de glicose, 10 g/L extrato de malte, 14 g/L peptona. Inicialmente coletou-se uma alíquota de 2 mL de meio do biorreator a cada 5 h de cultivo, em seguida centrifugou-se o meio a 12000 rpm, durante 3 min em centrífuga (Fanem, modelo 5403), descartou-se o sobrenadante e quantificou-se a massa celular por gravimetria em estufa (Nevoni NV-13) a 105 °C até massa constante.



Figura 7 Inóculo após 48 h de cultivo, a 180 rpm mantido a 25 °C

Os ensaios da bioprodução de carotenóides foram realizados em biorreator Biostat B (*Braun Biotech International*) com um volume útil de 1 L durante 100 h de cultivo, sem iluminação, conforme observado na Figura 8. Os parâmetros monitorados foram temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido, sendo o eletrodo de pH do biorreator calibrado antes da esterilização em autoclave vertical, enquanto que o oxímetro foi calibrado após esterilização. O antiespumante FG10 Dow Corning foi esterilizado em UV durante 40 min.



Figura 8 Bioprodução em biorreator Biostat, 1 L, durante 100 h sem iluminação

A composição do meio de cultivo e as condições experimentais da bioprodução foram determinadas conforme descrito no item 3.7, mediante utilização de técnica de planejamento experimental.

3.3 Recuperação dos Carotenóides Totais

Após a cultura, o meio fermentado foi centrifugado a 3000g, 5 °C durante 10 min em centrífuga refrigerada (Nova Ética, modelo MT-815). Em seguida, descartou-se o sobrenadante e as células (5 g) foram maceradas sucessivas vezes em almofariz com nitrogênio líquido, conforme demonstrado na Figura 9. Ao “pellet” macerado foram adicionados 6 mL de dimetilsufóxido (DMSO) (Vetec), e em seguida pré-aqueceu-se os tubos a 55 °C durante 30 min homogeneizando-se periodicamente com vortex (Phoenix AP-56). Em seguida, adicionou-se 10 mL de uma solução acetona:metanol (7:3) (Vetec:Quimex) e centrifugou-se a mistura de solventes e células maceradas a 3000g, 5 °C por 10 min. O sobrenadante foi coletado, e realizaram-se extrações sucessivas com acetona:metanol, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Fisatom) a 35 °C, e os pigmentos foram solubilizados em metanol (Quimex) ajustando-se o volume em balão volumétrico (Figura 10) conforme metodologia descrita por Valduga (2005).



Figura 9 Maceração das células de *S. salmonicolor* com nitrogênio líquido



Figura 10 Carotenóides após solubilização em metanol

3.4 Determinação dos Carotenóides Totais

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

3.5 Determinação dos Carotenóides Específicos

Após a obtenção dos carotenóides totais e a massa de células, realizou-se a determinação dos carotenóides específicos através da relação entre a quantidade de carotenóides totais produzidos e a massa celular obtida.

3.6 Determinações Analíticas

3.6.1 Determinação da massa de células

Após extração dos carotenóides, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas (3000g, 5 °C por 10 min) e a massa celular foi quantificada por gravimetria em estufa (Nevoni NV-13) a 105 °C até massa constante.

Para a cinética de bioprodução no ponto maximizado, o meio de cultura foi centrifugado (3000g, 5 °C por 10 min), o sobrenadante foi descartado e as células foram quantificadas por gravimetria em estufa (Nevoni NV-13) a 105 °C até massa constante.

3.6.2 Determinação de pH

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

3.6.3 Determinação de glicose

A concentração de glicose foi determinada no início e término da cultura no sobrenadante. O procedimento utilizado foi o método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme metodologia descrita por Miller (1959) e, a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553) no comprimento de onda de 505 nm.

Para a cinética do consumo de glicose no ponto maximizado do planejamento fatorial completo 2³, realizou a determinação de glicose pelo método enzimático Glicose PAP, Labtest Diagnóstica. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose, formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. A cor da reação final foi determinada em espectrofotômetro (Agilent 8553) a 505 nm.

3.6.4 Determinação de nitrogênio

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

3.7 Delineamento Experimental

Os efeitos da composição do meio de cultura e das condições de cultivo da cultura foram estudados através de um planejamento experimental tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 2 pontos centrais. As variáveis e níveis investigados foram determinados baseando-se na bioprodução de carotenóides por *S. salmonicolor* (CBS 2636) em frascos agitados, conforme trabalho realizado por Valduga (2005). As variáveis estudadas e seus respectivos níveis estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Variáveis e níveis testados no planejamento experimental tipo Plackett-Burman

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0*	1
Agitação (rpm)	X ₁	180	410	600
Aeração (vvm)	X ₂	0,5	1,5	2,5
pH	X ₃	3,0	4,0	5,0
Temperatura (°C)	X ₄	25	30	35
Glicose (g/L)	X ₅	20	40	60
Extrato de malte (g/L)	X ₆	5	10	15
Peptona (g/L)	X ₇	7	14	21

* Ponto central

Após a análise dos resultados do planejamento Plackett-Burman, realizou-se um segundo planejamento fatorial completo (2^3 com 3 pontos centrais). A Tabela 3 apresenta os valores codificados e reais do planejamento experimental completo, para 3 variáveis independentes e 3 níveis de variação, respectivamente.

Tabela 3 Variáveis e níveis investigados no planejamento fatorial completo 2^3

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0*	1
Aeração (vvm)	X ₂	0,5	1,0	1,5
Glicose (g/L)	X ₅	40	60	80
Peptona (g/L)	X ₇	15	25	35

* Ponto central

As variáveis independentes estudadas no segundo planejamento foram aeração, concentração de peptona e concentração de glicose, fixando-se a agitação (180 rpm), temperatura (25 °C), pH (4,0) e extrato de malte (5 g/L). A faixa de estudo do planejamento completo foi determinada a partir dos resultados do planejamento Plackett-Burman. As variáveis dependentes analisadas foram: concentração de carotenóides totais (µg/L), produção específica de carotenóides (µg/g), concentração de células (g/L), nitrogênio consumido (g/L), glicose consumida (g/L) e pH final.

3.7.1 Análise estatística

O planejamento experimental tipo Plackett-Burman e o planejamento Fatorial Completo 2^3 foram analisados através do Software *Statistica* 6.0, a um nível de confiança de 95 % e 90 %, respectivamente.

3.8 Cinética do processo fermentativo e parâmetros estequiométricas

Com o objetivo de obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de consumo de substrato (nitrogênio e glicose), produção celular, evolução de pH e produção de carotenóides, realizou-se coleta de amostras do caldo de fermentação a cada 10 h, para uma biorreação conduzida nas condições de cultivo referentes ao ponto maximizado do planejamento fatorial completo 2^3 .

3.8.1 Velocidades instantâneas e específicas

A partir dos perfis de concentração celular, formação de produto e consumo de substrato (glicose e nitrogênio) com o tempo, é possível determinar, por um balanço de massa para cada componente, as velocidades de crescimento microbiano (r_x), formação de produto (r_p) e consumo de substrato (r_s e r_n) descritas nas equações 1 a 4.

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

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

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

$$r_n = -\frac{dN}{dt} \quad (4)$$

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

$$\mu_x = \frac{r_x}{X} \quad (5)$$

$$\mu_p = \frac{r_p}{X} \quad (6)$$

$$\mu_s = \frac{r_s}{X} \quad (7)$$

$$\mu_n = \frac{r_n}{X} \quad (8)$$

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

3.8.2 Fatores de conversão

O fator de conversão de glicose em carotenóides produto, $Y_{P/S}$ (μg de carotenóides/g de glicose), foi expresso por:

$$Y_{P/S} = \frac{r_p}{r_s} = -\frac{dP}{dS} \quad (9)$$

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

$$Y_{P/N} = \frac{r_p}{r_n} = -\frac{dP}{dN} \quad (10)$$

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

$$Y_{X/S} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{dX}{dS} \quad (11)$$

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

$$Y_{X/N} = \frac{r_x}{r_n} = -\frac{dX}{dN} \quad (12)$$

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

$$Y_{P/X} = \frac{r_p}{r_x} = \frac{dP}{dX} \quad (13)$$

Onde:

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

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

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

r_p = velocidade de produção de carotenóides (μg/L.h)

3.8.3 Produtividade

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item estão apresentados os resultados das características de crescimento celular, efeitos das variáveis (temperatura, pH, agitação, aeração e composição do meio de cultivo), na bioprodução de carotenóides por *S. salmonicolor* CBS 2636 no biorreator, além dos parâmetros estequiométricos e da cinética de crescimento celular, produção de carotenóides, consumo de nitrogênio e glicose e evolução do pH.

4.1 Crescimento celular

A Figura 11 apresenta a morfologia das colônias da linhagem de levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). As colônias apresentaram cor salmão em meio YMA, com textura gomosa, não apresentando dificuldade na remoção do meio sólido.



Figura 11 Características morfológicas macroscópicas da linhagem *S. salmonicolor* (CBS 2636) cultivada em meio de cultura YMA, com 48 h de crescimento.

A Figura 12 apresenta a curva de crescimento celular (a) e a linearização (b), e a Figura 13 o comportamento do pH e oxigênio dissolvido para a bioprodução em biorreator nas condições: 410 rpm, 1,5 vvm, pH 4,0, 30 °C, 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona.

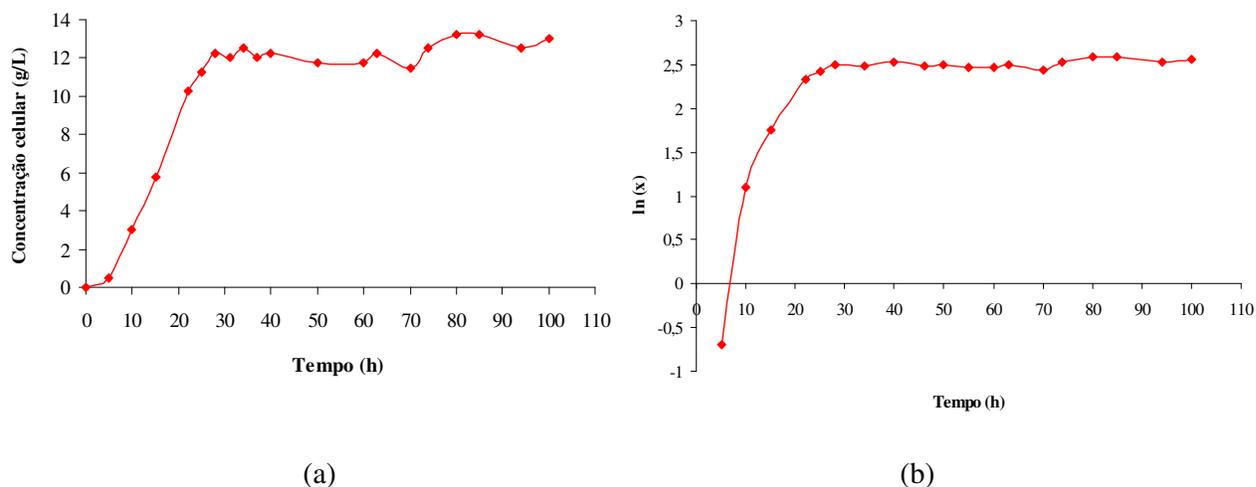


Figura 12 Crescimento celular (a) e curva linearizada (b) da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636), durante 100 h de bioprodução nas condições: 410 rpm, 1,5 vvm, pH 4,0, 30 °C, 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona

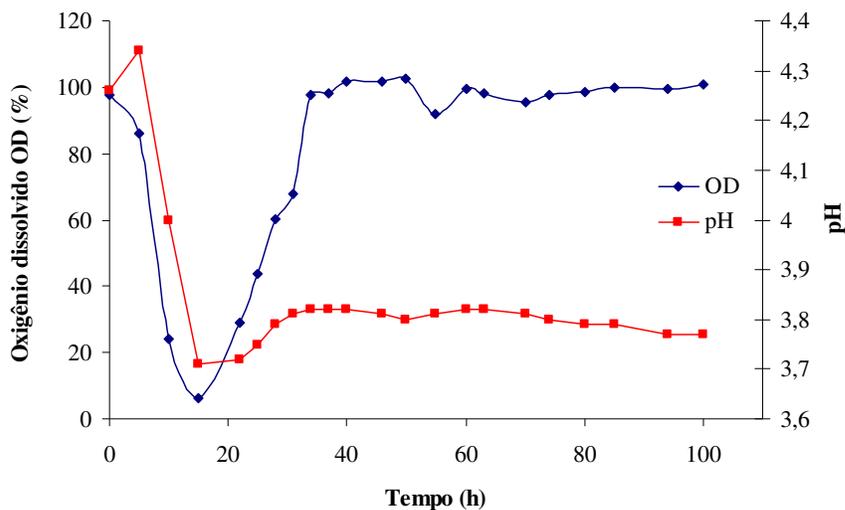


Figura 13 Comportamento do pH e oxigênio dissolvido durante 100 h de bioprodução nas condições 410 rpm, 1,5 vvm, pH 4,0, 30 °C, 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona.

Através da Figura 12 pode-se observar que a levedura apresentou crescimento logo após a inoculação, com fase exponencial até aproximadamente 10 h da biorreação, sendo observada a desaceleração do consumo de oxigênio e elevação do pH (Figura 13) após este

período. Seguida as 10 h de cultivo, deu-se crescimento linear até 20 h, permanecendo após este período na fase estacionária.

Durante a fase exponencial de crescimento celular, o pH e o oxigênio dissolvido decresceram (Figura 13), em seguida o pH apresentou pequena variação e a concentração de oxigênio aumentou até a saturação. A baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo após 10 h de bioprodução e a diminuição do pH, podem ter limitado o crescimento celular. Os períodos de decréscimo do pH e oxigênio dissolvido ocorreram provavelmente devido ao metabolismo das leveduras durante a fase exponencial, que leva a uma maior demanda de oxigênio e à possível formação de ácidos orgânicos. Comportamento semelhante foi observado por Ramírez et al. (2006) onde na fermentação de *P. rhodozyma* observou-se um decréscimo do pH na fase exponencial, e aumento após o final deste estágio, em seguida o pH permaneceu constante durante a fase estacionária até o final da biorreação. Da mesma forma, o consumo de oxigênio foi associado ao crescimento celular, sendo que o consumo máximo de oxigênio deu-se na fase exponencial e o menor consumo na fase estacionária de crescimento das células.

4.2 Bioprodução de carotenóides

4.2.1 *Screening* de variáveis para a bioprodução

A matriz com os valores reais e codificados das variáveis independentes, e os resultados do planejamento experimental Plackett-Burman em termos das respostas carotenóides totais, carotenóides específicos, células e pH final são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Matriz do planejamento Plackett-Burman (valores reais e codificados) e respostas carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$), carotenóides específicos ($\mu\text{g/g}$), células (g/L) e pH final em 100 h de bioprodução

Ensaio	Variáveis Independentes*							Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Carotenóides Totais ($\mu\text{g/L}$)	Carotenóides Específicos ($\mu\text{g/g}$)	Células (g/L)	pH Final
1	600(1)	0,5(-1)	5(1)	25(-1)	20(-1)	5(-1)	7(-1)	520,00	95,88	5,42	4,88
2	600(1)	2,5(1)	3(-1)	35(1)	20(-1)	5(-1)	7(-1)	174,05	271,11	0,64	2,61
3	180(-1)	2,5(1)	5(1)	25(-1)	60(1)	5(-1)	7(-1)	264,07	65,92	4,00	4,39
4	600(1)	0,5(-1)	5(1)	35(1)	20(-1)	15(1)	7(-1)	504,82	178,69	2,82	4,47
5	600(1)	2,5(1)	3(-1)	35(1)	60(1)	5(-1)	21(1)	508,86	330,00	1,54	2,66
6	600(1)	2,5(1)	5(1)	25(-1)	60(1)	15(1)	7(-1)	883,00	143,78	6,14	4,60
7	180(-1)	2,5(1)	5(1)	35(1)	20(-1)	15(1)	21(1)	492,70	92,89	5,30	4,78
8	180(-1)	0,5(-1)	5(1)	35(1)	60(1)	5(-1)	21(1)	524,94	165,17	3,17	4,55
9	180(-1)	0,5(-1)	3(-1)	35(1)	60(1)	15(1)	7(-1)	460,15	363,76	1,26	2,88
10	600(1)	0,5(-1)	3(-1)	25(-1)	60(1)	15(1)	21(1)	523,49	79,02	6,62	2,21
11	180(-1)	2,5(1)	3(-1)	25(-1)	20(-1)	15(1)	21(1)	467,17	131,96	3,55	2,59
12	180(-1)	0,5(-1)	3(-1)	25(-1)	20(-1)	5(-1)	7(-1)	179,92	128,24	1,40	2,71
13	410(0)	1,5(0)	4(0)	30(0)	40(0)	10(0)	14(0)	796,86	122,54	6,50	3,61
14	410(0)	1,5(0)	4(0)	30(0)	40(0)	10(0)	14(0)	803,04	120,39	6,67	3,80

*X₁ = Agitação (rpm) , X₂ = Aeração (vvm) , X₃ = pH , X₄ = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) , X₅ = Glicose (g/L) , X₆ = Extrato de malte (g/L) , X₇ = Peptona (g/L)

A maior concentração de carotenóides totais observada foi de 883 $\mu\text{g/L}$ no ensaio 6, onde os parâmetros agitação, aeração, pH, concentração de glicose e concentração de extrato de malte, apresentavam os maiores níveis da faixa investigada, e temperatura e concentração de peptona os menores níveis.

A menor concentração de carotenóides totais e células foram obtidas no ensaio 2, sendo 174,0 $\mu\text{g/L}$ e 0,64 g/L , respectivamente. Neste experimento encontravam-se as menores concentrações de extrato de malte, glicose e peptona, bem como o menor valor de pH testado. O mesmo foi observado no ensaio 12, o qual também apresentou concentração baixa de carotenóides para os menores níveis das variáveis estudadas.

A maior concentração de células obtida neste estudo foi observada no ponto central (6,7 g/L). Em trabalho com *S. salmonicolor* em frascos agitados, Valduga (2005) obteve uma concentração que variou de 1,2 g/L a 5,9 g/L , dependendo das condições de cultivo.

Maldonade et al. (2008) avaliaram o crescimento celular de *Sporobolomyces* em meio YM, obtendo 3,3 g/L após 5 dias de fermentação.

Buzzini et al. (2007) avaliaram a produção de carotenóides de 4 cepas de *Sporobolomyces* e 3 cepas de *Sporidiobolus*. O cultivo foi realizado durante 5 dias em frascos agitados a 150 rpm, 25 °C, pH 5,5 em 100 mL de meio, sendo este composto de 40 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de levedura, 0,8 g/L de KH_2PO_4 e 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Dentre as leveduras *Sporobolomyces* testadas, *S. roseus* apresentou maior produção de carotenóides totais (632 µg/L), e para as leveduras *Sporidiobolus* destacaram-se *Sporidiobolus longiusculus* (1993,4 µg/L) e *S. salmonicolor* (613,3 µg/L).

Nos ensaios 2, 5, 9 e 12 observou-se uma alta concentração específica de carotenóides. No entanto, a produção de carotenóides totais foi relativamente baixa, isso provavelmente devido ao microrganismo ter sido exposto a condições extremas, tais como o ensaio 2, o qual apresentava altas taxas de aeração (2,5 vvm) e agitação (600 rpm), baixas concentrações de glicose (20 g/L), peptona (7 g/L) e extrato de malte (5 g/L), baixo valor de pH (3,0) e alta temperatura (35 °C). O estresse aplicado às células pode ter provocado uma produção superior de pigmento. Assim, apesar de um menor crescimento, ocorreu maior acúmulo de carotenóides intracelularmente.

Comparando-se o pH inicial e final, não foi observado aumento de pH no término da biorreação em nenhum experimento do planejamento Plackett-Burman, provavelmente devido ao fato de não ter ocorrido carência de nutrientes no meio de cultivo. O pH inicial ótimo para o crescimento celular e concentração de carotenóides totais variou de 4,0 a 5,0, enquanto que para a produção específica de carotenóides os valores foram próximos a 3,0.

O efeito do pH inicial do meio na produção de carotenóides e células foi avaliado por outros autores. Valduga (2005) verificou que o melhor pH de crescimento para *S. salmonicolor* encontra-se entre 4,0 e 5,0, enquanto que a máxima produção de carotenóides dá-se em pH 4,0. Maldonade et al. (2008) observaram que a máxima concentração de carotenóides totais por *R. glutinis* foi de 1269 µg/L, com pH inicial de 4,0; sendo que a variação do pH inicial (3,0 a 4,5) exerceu pequena influência na produção de carotenóides. Entretanto, Shih & Hang (1996) observaram que o pH inicial do meio de fermentação afetou significativamente ($p < 0,05$) a produção de carotenóides totais por *R. rubra*, onde na faixa de pH de 3,4 a 4,3, houve inibição de crescimento celular e de produção de carotenóides. A máxima concentração celular e de pigmentos ocorreu em pH inicial 5,0.

Conforme observado na Figura 14, a qual apresenta o resultado da análise estatística do planejamento Plackett-Burman para carotenóides totais (Tabela 4), as variáveis temperatura e

aeração apresentaram efeito significativo negativo ($p < 0,05$), ou seja, na faixa estudada, o aumento da temperatura e da taxa de aeração ocasionaria uma redução na concentração de carotenóides totais.

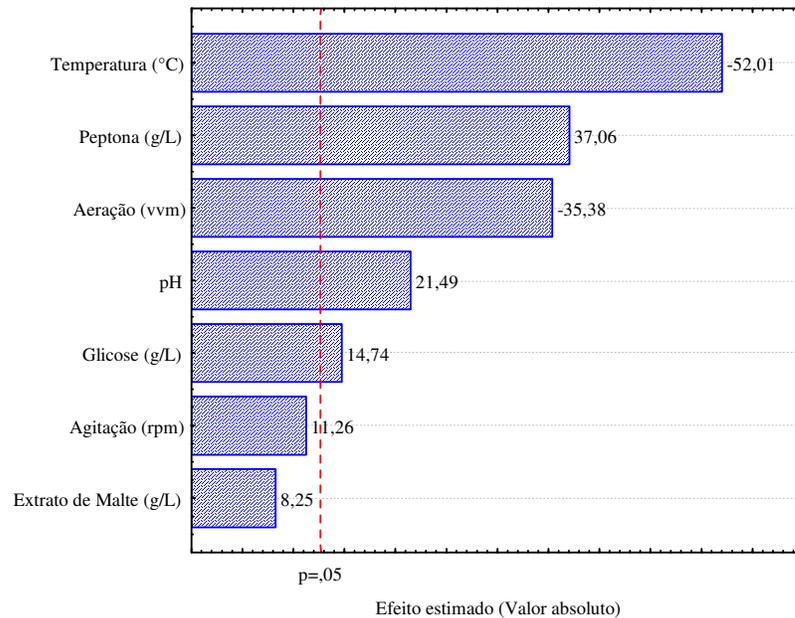


Figura 14 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$)

As variáveis independentes concentração de peptona, pH e concentração de glicose apresentaram efeito significativo positivo ($p < 0,05$). Sendo assim, para um maior rendimento de carotenóides totais, tem-se a necessidade de ampliação da faixa investigada. Dentre essas variáveis, a concentração de peptona e o pH foram as que apresentaram maior influência na produção de carotenóides totais, seguidas da concentração de glicose. Os demais parâmetros não apresentaram efeito significativo na concentração de carotenóides totais ao nível de 95 % de confiança.

Os efeitos das condições de cultivo na produção de carotenóides em frascos agitados por *S. salmonicolor* foram estudados por Valduga (2005), onde glicose, peptona, agitação e extrato de malte apresentaram efeito positivo na concentração de carotenóides totais.

Fang & Chiou (1996) aumentaram a produção de astaxantina por *P. rhodozyma* otimizando as condições de cultivo, sendo que o extrato de levedura e a glicose foram as melhores fontes de nitrogênio e carbono, resultando em uma concentração de 7890 $\mu\text{g/L}$. Resultados similares foram obtidos por Yamane et al. (1997), que observaram que ocorreu um

aumento de até 12 vezes na produção de β -caroteno quando *P. rhodozyma* foi cultivada em um meio com concentração de glicose de 5 % (p/v). Em outro estudo, Haard (1988) isolou β -caroteno e β -zeacaroteno como principais pigmentos de *P. rhodozyma* em meio com 100 g/L de glicose. Sutherland et al. (1996) verificaram que para o cultivo de *P. rhodozyma* as melhores fontes de carbono são glicose e sacarose, porém em altas concentrações de glicose ocorreu inibição da produção de astaxantina.

Em estudo realizado por Choudhari & Singhal (2008) a concentração de glicose foi uma das variáveis de maior importância nas fermentações microbianas com *Blakeslea trispora*, isso devido a glicose ser facilmente assimilada na via metabólica da biossíntese de β -caroteno, sendo que onde a glicose foi empregada obteve-se uma concentração máxima de β -caroteno de 99 mg/L. O mesmo teor de β -caroteno foi observado ao utilizar do extrato de levedura, enquanto que a concentração de peptona de carne levou a um menor crescimento celular e baixa produção de pigmento. A otimização das condições de cultivo aumentou em 42 % a produção de β -caroteno.

No cultivo de *Blakeslea trispora* (MANTZOURIDOU et al., 2002) em biorreator com agitação de 150 e 325 rpm, o aumento da aeração de 0,5 para 1,5 vvm, ocasionou maior produção de β -caroteno. Isso devido à aeração melhorar a mistura do meio fermentativo, mantendo o gradiente de concentração entre o exterior e o interior das células. Porém, em agitação superior a 325 rpm, ocorreu um decréscimo na concentração de β -caroteno com o aumento da aeração. Tal resultado pode ser explicado devido às altas taxas de agitação e aeração provocarem a oxidação do pigmento.

A temperatura controla a concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenóides, e mudanças na concentração enzimática definitivamente controlam os níveis de carotenóides nos microrganismos (HAYMAN et al., 1974).

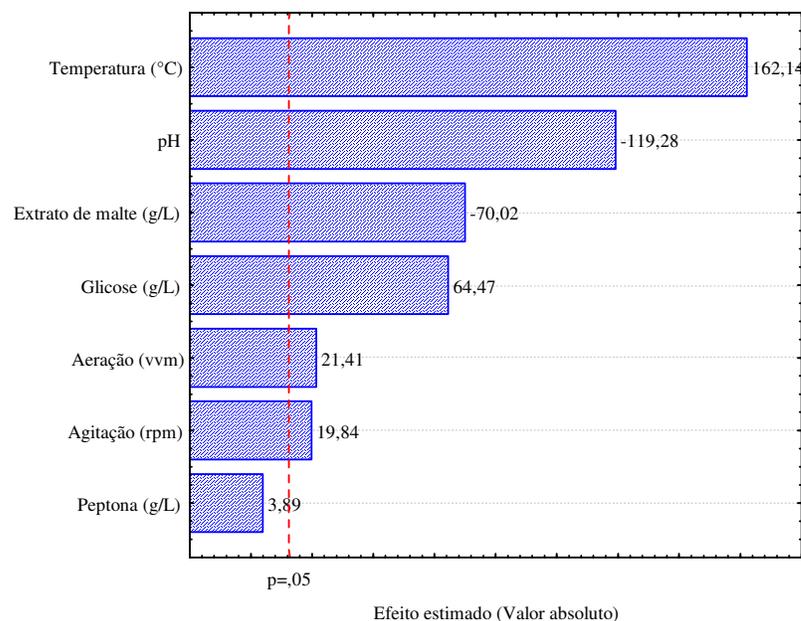


Figura 15 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a concentração específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)

Evidencia-se através da Figura 15 que somente a variável peptona não proporcionou efeito significativo à concentração de carotenóides específicos. Na faixa estudada, a temperatura, aeração, concentração de glicose e agitação apresentaram efeitos significativos positivos a um nível de 95 % de confiança. Assim, o aumento nestes parâmetros ocasionaria a uma elevação na concentração específica de carotenóides. A temperatura e a concentração de glicose foram as variáveis de maior influência na concentração de carotenóides específicos, seguidas de aeração e agitação.

A agitação apresentou efeito positivo ($p < 0,05$), isso pode ser devido ao exposto por Tinoi et al. (2005), onde em baixas taxas de agitação espera-se menor crescimento celular devido à carente disponibilidade e homogeneidade de nutrientes na superfície individual das células.

O pH e a concentração de extrato de malte apresentaram efeito negativo ($p < 0,05$). Assim, para uma maior produção específica de carotenóides necessita-se diminuir os valores de pH e extrato de malte.

O efeito do pH na levedura *S. ruberrimus* foi avaliado por Razavi & March (2006), apresentado um intenso efeito sobre o conteúdo de carotenóides e células. A carotenogênese e

o crescimento foram induzidos pela elevação do pH (pH 3,5 a 6,0), sendo pH 6,0, ótimo para o crescimento celular e formação de pigmento.

Valduga (2005) verificou que as variáveis concentração de glicose, concentração de peptona, concentração de extrato de malte e agitação apresentaram efeitos positivos significativos ($p < 0,05$) em frascos agitados. No presente trabalho, ao contrário, no biorreator a concentração de extrato de malte foi prejudicial para a concentração de carotenóides específicos, porém foi benéfica para o crescimento celular, uma hipótese seria que o consumo de extrato de malte dá-se para o crescimento celular e não para a carotenogênese.

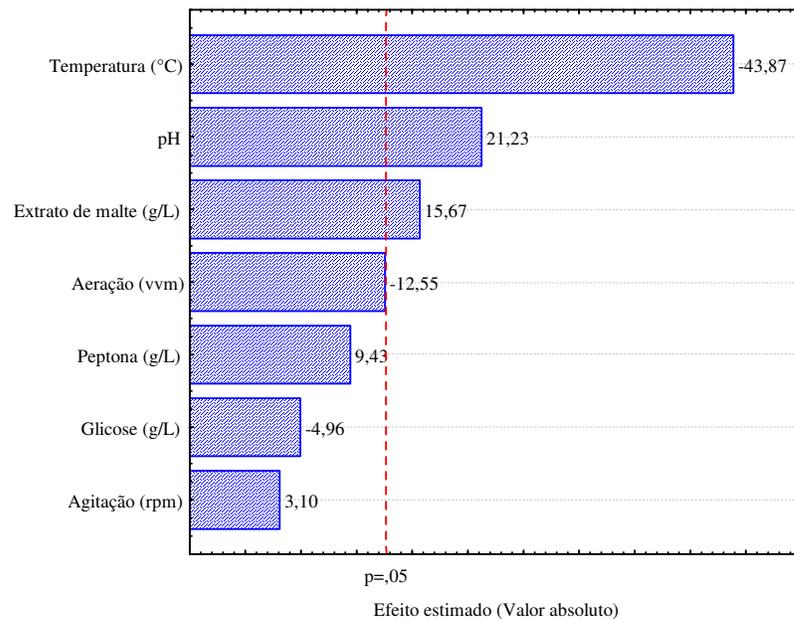


Figura 16 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett-Burman, para crescimento celular (g/L)

A Figura 16 apresenta os efeitos significativos negativos e positivos em relação à concentração de células no biorreator. Temperatura e aeração influenciaram significativamente ($p < 0,05$) e negativamente no crescimento celular. Sendo assim, verifica-se a necessidade de diminuição da faixa estudada para o incremento da concentração de células.

O extrato de malte e pH apresentaram efeito significativo positivo, induzindo ao aumento destas variáveis para maior crescimento celular. Os parâmetros peptona, glicose e agitação não apresentaram efeito significativo ao nível de 95 % de confiança.

Valduga (2005) mostrou que para concentração de células cultivadas em frascos agitados, somente os parâmetros extrato de malte, extrato de levedura e agitação apresentaram

efeito significativo positivo, o crescimento celular no biorreator sofreu influência positiva não somente do extrato de malte, mas também do pH, conforme discutido anteriormente.

Em estudo realizado por Mantzouridou et al. (2002), em uma agitação de 150 rpm, foi observado aumento da concentração de células de *Blakeslea trispora* com a elevação da aeração de 0,5 vvm para 1,0 vvm, permanecendo constante esta produção celular em aeração mais alta. Por outro lado, em agitação de 325 rpm e 500 rpm, acima de 1,0 vvm observou-se diminuição na concentração de células. Assim, a combinação de moderadas taxas de aeração com altas taxas de agitação melhoram o crescimento celular devido ao maior suprimento de ar às células.

Após a análise dos efeitos significativos no planejamento Plackett-Burman, definiram-se os parâmetros de estudo para o segundo planejamento estatístico. Como o objetivo principal deste trabalho foi de incrementar a concentração de carotenóides, o planejamento fatorial completo para a maximização da produção de carotenóides foi baseado nos resultados apresentados da resposta carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$).

A comparação entre as Figuras 14 e 16 evidencia que para o aumento da concentração de carotenóides totais e células, faz-se necessário diminuir as faixas de temperatura e aeração estudadas. Assim, fixou-se a variável temperatura em seu valor mínimo (-1), e como para carotenóides específicos a aeração apresentou efeito positivo, optou-se por analisar novamente a variável aeração visando à maximização da bioprodução.

Na concentração específica de carotenóides fazia-se necessário reduzir o valor de pH para melhor rendimento, ao contrário de carotenóides totais e produção celular, onde se obteve efeito positivo. Assim, baseando-se nos valores de pH final apresentados na Tabela 4, observa-se que em pH 4 ocorreram maiores crescimento celular e concentração de carotenóides totais. Dessa forma, fixou-se o valor de pH em 4,0 para os demais estudos, já que em pH 3,0 foram obtidas as menores concentrações de células provavelmente devido à inibição do crescimento celular.

Sendo assim, as variáveis independentes agitação, pH, temperatura e extrato de malte foram fixadas em 180 rpm, 4,0, 25 °C e 5 g/L, respectivamente. As faixas de concentração de glicose e de peptona devido ao efeito positivo sobre carotenóides totais, foram ligeiramente aumentadas, e com o efeito negativo da aeração sobre a produção de carotenóides totais, diminuiu-se a faixa estudada. As faixas investigadas das variáveis independentes estão apresentadas na Tabela 3.

4.2.2 Maximização da bioprodução

A Tabela 5 apresenta os valores reais e codificados do planejamento fatorial completo 2^3 e as respostas para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$), produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e concentração de células (g/L).

Tabela 5 Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$), produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) e concentração de células (g/L) para a bioprodução de 100 h nas condições fixas: pH 4,0, temperatura de 25 °C, 180 rpm e concentração de extrato de malte de 5 g/L

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas		
	X ₂	X ₇	X ₅	Carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$)	Carotenóides específicos ($\mu\text{g/g}$)	Células (g/L)
1	0,5 (-1)	15 (-1)	40 (-1)	1015,52	96,71	10,50
2	0,5 (-1)	15 (-1)	80 (1)	1111,21	107,88	10,30
3	0,5 (-1)	35 (1)	40 (-1)	822,24	100,03	8,22
4	0,5 (-1)	35 (1)	80 (1)	950,27	141,20	6,73
5	1,5 (1)	15 (-1)	40 (-1)	1877,33	190,78	9,84
6	1,5 (1)	15 (-1)	80 (1)	3318,58	326,63	10,16
7	1,5 (1)	35 (1)	40 (-1)	850,82	85,08	10,00
8	1,5 (1)	35 (1)	80 (1)	725,07	94,90	7,64
9	1,0 (0)	25 (0)	60 (0)	2095,68	191,03	10,97
10	1,0 (0)	25 (0)	60 (0)	1786,03	188,20	9,49
11	1,0 (0)	25 (0)	60 (0)	2045,88	214,45	9,54

*X₂ = aeração (vvm); X₅ = glicose (g/L); X₇ = peptona (g/L)

As máximas concentrações de carotenóides totais (3318,6 $\mu\text{g/L}$) e carotenóides específicos (326,6 $\mu\text{g/g}$) foram observadas no ensaio 6, onde o meio de cultivo apresentava a maior concentração de glicose (80 g/L), menor concentração de peptona (15 g/L) e taxa de aeração de 1,5 vvm. Os pontos centrais também apresentaram uma concentração de carotenóides elevada. Na Figura 17 apresenta-se o aspecto visual dos carotenóides dos ensaios 6, 7, 8 e 9 do planejamento experimental completo 2^3 .



Figura 17 Aspecto visual dos carotenóides dos ensaios 6, 7, 8 e 9 do planejamento fatorial completo 2³

Os ensaios 5, 6, 9, 10 e 11 apresentaram coloração mais próxima do vermelho que os demais experimentos do planejamento completo, podendo a diferenciação da coloração ser justificada pela mudança na via biossintética da levedura ou maior concentração de carotenóides. As variações nas taxas de aeração e concentração de substrato, podem ter provocado alterações na biossíntese da levedura, gerando assim diferentes tipos de carotenóides, corantes do laranja ao vermelho. Em estudo realizado por Davoli et al. (2004), a levedura *S. roseus* como resposta ao estresse oxidativo gerado pela aeração, passou a produzir maiores quantidades de γ -caroteno, e desviou a biossíntese a partir do β -caroteno diretamente para os carotenóides vermelhos (toruleno e torularrodina). O aumento na síntese de torularrodina pode ser devido ao oxigênio afetar a carotenogênese na levedura, atuando em mudanças bioquímicas específicas e, portanto, canalizando a biossíntese em direção à produção de carotenóides particulares. Valduga (2005) obteve como carotenóide majoritário o β -caroteno, uma proporção de 32 % em relação aos carotenóides totais.

As diferenças na biossíntese de carotenóides em diferentes aerações também foram observadas por Yokoyama & Miki (1995), onde a bactéria *Agrobacterium aurantiacum* apresentou uma composição de carotenóides diferente nas 3 condições testadas (A – 300 mL de meio, B – 400 mL de meio, C – 100 mL de meio).

Valduga (2005) obteve para *S. salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados, um teor máximo de carotenóides totais de 1019 $\mu\text{g/L}$ nas condições pH 4,0, 25 °C, 180 rpm, 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona. Com a biorreação em biorreator

obteve-se um aumento na concentração de carotenóides totais de aproximadamente 3,3 vezes, utilizando-se pH 4,0, temperatura de 25 °C, agitação de 180 rpm, aeração 1,5 vvm, concentração de glicose de 80 g/L, concentração de peptona de 15 g/L e concentração de extrato de malte de 5 g/L. A produção superior de carotenóides totais no biorreator, obtida no presente trabalho, pode ser devido às mudanças geradas com a agitação e a aeração, proporcionando, além da maior aeração do meio, maior homogeneidade no meio de cultura, e conseqüentemente melhor disponibilidade de nutrientes e oxigênio.

Quando se compara o rendimento em carotenóides totais do planejamento Plackett-Burman e os resultados do planejamento fatorial completo, observa-se um incremento de 3,8 vezes na produção de corante (ensaio 6).

Buzzini et al. (2007) obtiveram uma produção de carotenóides totais de 613,3 µg/L e carotenóides específicos de 34,7 µg/g, para a levedura *S. salmonicolor* CBS 490, com cultivo em frascos agitados. No presente trabalho, em biorreator, com a maximização da produção pela levedura *S. salmonicolor* CBS 2636, foi obtida uma concentração de carotenóides totais 5,5 vezes maior e carotenóides específicos 9,5 vezes superior ao encontrado no trabalho de Buzzini et al. (2007).

Na literatura vários trabalhos relatam a otimização da bioprodução de carotenóides com diferentes microrganismos e condições de cultivo tais como, agitação, temperatura, pH e meio de cultivo. Buzzini et al. (2005) avaliaram a produção de pigmentos pelo microrganismo *R. graminis*, relacionando traços de metais no meio de cultivo, obtendo nas condições otimizadas 803,2 µg/g, um aumento de cerca de 370 % em relação ao ponto central do planejamento aplicado. O trabalho de Chen et al. (2006), combinou planejamento Plackett-Burman e fatorial completo para o cultivo de *Rhodobacter sphaeroides* observando nas condições otimizadas uma concentração de carotenóides totais 17,2 mg/L. A produção de astaxantina após a otimização, foi aumentada em 92 % no cultivo de *P. rhodozyma* por Ramírez et al. (2001). Wang et al. (2007) submetendo a levedura *R. glutinis* a alta pressão (300 MPa durante 15 min) e otimizando o meio de cultivo, obteve um aumento de 34,2 % na produção de carotenóides (13,4 mg/L).

A Figura 18 apresenta os efeitos das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2³ para a resposta carotenóides totais.

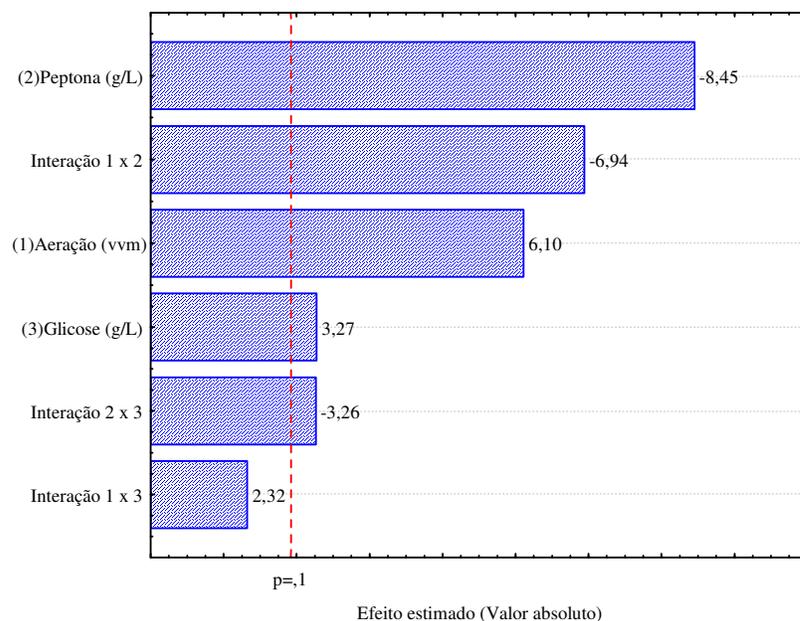


Figura 18 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^3 , para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$)

As variáveis independentes concentração de peptona, interação aeração e concentração de peptona, e interação concentração de peptona e concentração de glicose, apresentaram efeitos negativos ($p < 0,1$) na concentração de carotenóides totais. Assim, para o aumento na resposta deve-se diminuir a faixa de concentração de peptona. O efeito da peptona na concentração de carotenóides totais é dependente não somente da aeração, mas também da concentração de glicose no meio de cultivo.

Valduga (2005) mostrou que no cultivo de *S. salmonicolor* (CBS 2636) em frascos agitados, a concentração de peptona e interação da concentração de peptona e concentração de glicose apresentaram efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) para carotenóides totais, resultados estes contrários aos obtidos no biorreator, isso pode ser devido a aeração e agitação fornecidas, bem como aumento no volume de meio de produção.

Efeito positivo e significativo ($p < 0,1$) foi observado para a concentração de glicose, desta forma, para um maior rendimento de carotenóides totais, é necessária a ampliação da faixa investigada.

Para Orosa et al. (2004) o efeito da peptona foi positivo na produção de carotenóides totais e astaxantina por *P. rhodozyma*, as melhores concentrações de carotenóides totais (6,0 e 6,3 mg/L) foram obtidas nas maiores concentrações de peptona (6 g/L) e extrato de malte (6 g/L), porém em valores intermediários de extrato de levedura (3 g/L).

Na fermentação mista em 2 fases de *X. dendrorhous* e *B. circulans* (FANG & WANG, 2002), a utilização de peptona e caseína como fontes de nitrogênio geraram as maiores quantidades de carotenóides totais, sendo na primeira fase 6040 µg/L e 5760 µg/L, respectivamente, e na segunda fase ambas fontes produziram 6450 µg/L.

Na produção de carotenóides por *X. dendrorhous* em frascos agitados, a glicose e o sulfato de amônia apresentaram efeito significativo não somente no crescimento celular, como também na biossíntese de carotenóides. Porém, o crescimento celular requer concentrações mais altas destes nutrientes, enquanto que na biossíntese é necessária uma concentração mais baixa. Tal fato pode ser explicado devido a carotenóides serem produtos do metabolismo secundário neste microrganismo, sendo sintetizados principalmente em condições de estresse, como carência de nutrientes (LIU & WU, 2007).

A elevação da concentração de glicose de 2,5 g/L até 20 g/L, proporcionou aumento nas taxas de formação de produto e crescimento celular específico de *R. glutinis*. A produção de carotenóides aumentou de 14,2 mg/L a 69 mg/L (AKSU & EREN, 2007).

Foi observado efeito positivo e significativo ($p < 0,1$) para a taxa de aeração no biorreator. A aeração acarretou um aumento na concentração de carotenóides no estudo realizado por Aksu & Eren (2007) com *R. glutinis*. Segundo Davoli et al. (2004), a aeração pode ser benéfica ao crescimento e performance das células devido à melhora das características de transferência de massa em relação a substrato, oxigênio e produto.

No estudo realizado por Liu et al. (2006), o aumento da taxa de agitação e a diminuição do volume de líquido no cultivo de *P. rhodozyma* acarretaram em incremento na concentração de biomassa e carotenóides. O coeficiente de transferência de oxigênio K_{La} em frascos agitados diminuiu com o volume de líquido e aumentou com a velocidade de agitação.

A aeração foi analisada por Davoli & Weber (2002) em cultivo de *S. roseus* em frascos com 200 mL de meio YES, sob agitação de 120 rpm, 22 °C, durante 4 dias. Os frascos com recortes nas laterais proporcionaram melhor aeração, e o meio apresentou-se vermelho brilhante, enquanto que o meio em frascos padrão proporcionou coloração marrom escura.

A Tabela 6 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para o teor de carotenóides específicos a um nível de confiança de 90 %. Observa-se que as variáveis independentes concentração de glicose, aeração, concentração de peptona e a interação aeração e concentração de peptona exercem influência significativa ($p < 0,1$) sobre a produção de carotenóides específicos.

Tabela 6 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo 2³ para carotenóides específicos

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média*	157,90	4,34	36,35	0,0008
(1)Aeração*	31,45	5,09	6,17	0,0253
(2)Peptona*	-37,60	5,09	-7,38	0,0179
(3)Glicose*	24,75	5,09	4,86	0,0398
Interação 1 x 2*	-46,76	5,09	-9,18	0,0117
Interação 1 x 3	11,67	5,09	2,29	0,1492
Interação 2 x 3	-12,00	5,09	-2,36	0,1426

*fatores estatisticamente significativos (p<0,1)

Os parâmetros que não foram significativos a um nível de confiança de 90 % foram adicionados à falta de ajuste na análise de variância.

A Equação 14 apresenta o modelo codificado de primeira ordem, que descreve a concentração de carotenóides específicos em função das variáveis independentes analisadas (aeração, concentração de glicose e concentração de peptona), dentro da faixa estudada. Através da análise de variância (Tabela 7) obtiveram-se o coeficiente de correlação (0,87) e o F calculado (1,5 vezes maior que o valor absoluto), os quais permitiram a validação do modelo apresentado na equação 14.

Tabela 7 Análise de variância para os carotenóides específicos do planejamento fatorial completo 2³

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	41612,30	4	10403,08	5,08
Resíduo	12297,99	6	2049,67	
Falta de Ajuste	11882,80	4		
Erro Puro	415,19	2		
Total	53910,29	10		

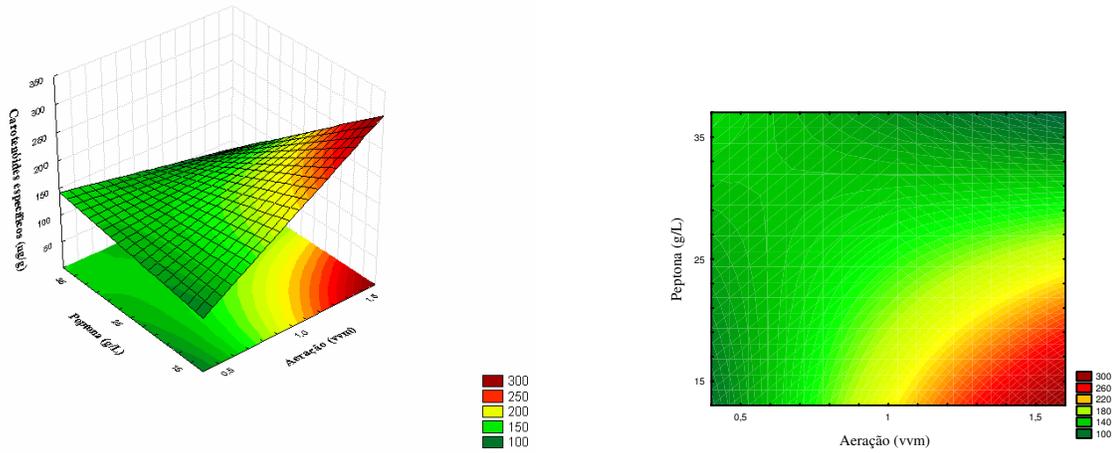
Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de correlação R = 0,87; F_{tab, 90%} = 3,18

A equação 14 apresenta o modelo codificado para as variáveis estudadas (aeração, concentração de peptona e concentração de glicose) do planejamento fatorial completo 2^3 para a resposta carotenóides específicos.

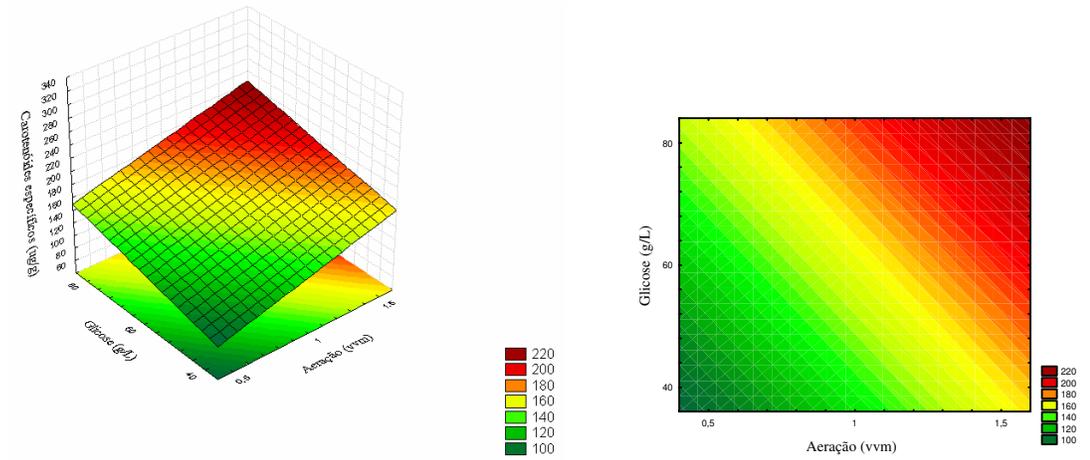
$$C_{\text{espec}} = 157,90 + 31,45.X_2 - 37,60.X_7 + 24,75.X_5 - 46,76.X_2.X_7 \quad (14)$$

Onde: C_{espec} = carotenóides específicos ($\mu\text{g/g}$); X_2 = aeração; X_7 = peptona; X_5 = glicose

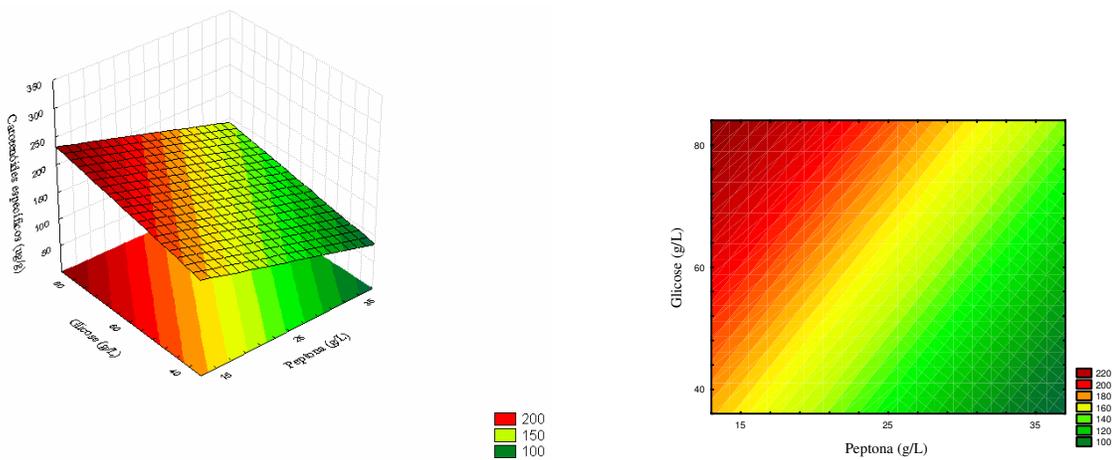
Com o modelo empírico validado, construíram-se as superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 19.



(a)



(b)



(c)

Figura 19 Superfícies de resposta e curvas de contorno para carotenóides específicos (µg/g) em função da concentração de peptona e aeração (a), concentração de glicose e aeração (b) e concentração de glicose e concentração de peptona (c)

A Figura 19 permite acompanhar o comportamento das variáveis significativas na produção específica de carotenóides. Conforme observado em (a) e (b), para a otimização do processo faz-se necessário aumentar a faixa investigada da aeração e da concentração de glicose, enquanto que a concentração de peptona necessita ser reduzida para melhor produção específica de corante.

Assim, a aeração fornecida e controlada no biorreator pode ter melhorado a distribuição de oxigênio e glicose no meio de cultivo, causando um incremento na concentração de carotenóides específicos. No entanto em relação à concentração de peptona, a melhor distribuição deste nutriente no meio pode ter sido prejudicial à produção específica de corante.

No estudo realizado por Valduga (2005), para a produção específica de carotenóides em frascos agitados, os resultados obtidos foram diferentes dos apresentados no biorreator. O extrato de malte foi a única variável que apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) e negativo na bioprodução de carotenóides em frascos agitados. No biorreator a concentração de glicose e peptona, bem como a aeração e a interação entre aeração e peptona apresentaram efeitos significativos ($p < 0,1$), sendo a aeração e a glicose benéficas para a produção de pigmentos enquanto que a peptona e a interação entre aeração e peptona proporcionaram efeito negativo na bioprodução. As diferentes condições de cultivo entre o biorreator e frascos agitados, tais como aeração, volume de líquido e agitação com 2 turbinas de pás planas podem ter acarretado mudanças no metabolismo das leveduras.

No estudo de Sun et al. (2004) a concentração de peptona foi benéfica para a produção de carotenóides por *P. rhodozyma*. Dentre as fontes de nitrogênio testadas, a peptona apresentou as maiores concentrações de biomassa (4 mg/mL), carotenóides totais (13,2 mg/mL) e carotenóides específicos (3,2 mg/g).

Maldonado et al. (2008) avaliando leveduras brasileiras pigmentadas, obteve um conteúdo de carotenóides específicos máximo de 132 $\mu\text{g/g}$ para *R. glutinis*, mínimo para *R. minuta* 33 $\mu\text{g/g}$ e 72 $\mu\text{g/g}$ para *S. roseus*. Valduga (2005) para os ensaios de otimização da bioprodução com *S. salmonicolor* obteve uma concentração específica de carotenóides variando de 65,2 $\mu\text{g/g}$ a 338,9 $\mu\text{g/g}$. Buzzini et (2007) obteve uma concentração máxima de carotenóides específicos para as leveduras *Sporidiobolus* testadas de 184 $\mu\text{g/g}$ para *S. longiusculus*, das *Sporobolomyces*, 82,3 $\mu\text{g/g}$ para *S. roseus*, e das leveduras do gênero *Rhodotorula*, uma concentração máxima de 138,6 $\mu\text{g/g}$ para *Rhodotorula* sp. Segundo Li et al. (2008), a exposição de *Rhodotorula* sp. Y11 ao metal cádmio, resultou em aumento na concentração de carotenóides específicos. Com 12 h de crescimento, a adição de 100 mg/L de

cádmio aumentou a concentração de corante de 103,6 µg/g para 121,4 µg/g; com 24 h a concentração de carotenóides acresceu de 144,1 µg/g para 183,1 µg/g.

A Tabela 8 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a concentração de células (g/L). Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância.

Tabela 8 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial completo 2³ para concentração de células

	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média*	9,40	0,25	37,09	0,0007
(1)Aeração	0,24	0,30	0,80	0,5099
(2)Peptona*	-1,03	0,30	-3,45	0,0746
(3)Glicose	-0,47	0,30	-1,57	0,2572
Interação 1 x 2	0,44	0,30	1,47	0,2798
Interação 1 x 3	-0,04	0,30	-0,15	0,8964
Interação 2 x 3	-0,50	0,30	-1,67	0,2368

*fatores estatisticamente significativos (p<0,1)

A equação 15 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve a resposta produção de células em função das variáveis independentes analisadas (peptona, glicose e aeração), dentro da faixa estudada. Verifica-se que através da análise de variância (Tabela 9), obtiveram-se o coeficiente de correlação de 0,90 e o F calculado de 2,5 vezes maior que o valor tabelado, os quais permitiram a validação do modelo apresentado na equação 15.

Tabela 9 Análise de variância do planejamento completo 2³ para a concentração de células

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	8	1	8,42	8,58
Resíduo	9	9	0,98	
Falta de Ajuste	7,42	7		
Erro Puro	1,41	2		
Total	17,26	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de correlação R = 0,90; F_{tab, 90%} = 3,36

A equação 15 apresenta o modelo codificado para as variáveis estudadas (aeração, concentração de peptona, concentração de glicose) do planejamento fatorial completo 2^3 para a resposta concentração de células.

$$\text{Células} = 9,40 - 1,03.X_7 \quad (15)$$

Onde: Células (g/L); X_7 = peptona

Observa-se que para incrementar o conteúdo celular (Tabela 8), a concentração de peptona necessita ser reduzida a valores inferiores a 15 g/L, sendo que as demais variáveis, glicose e aeração encontram-se na faixa ótima para o crescimento celular.

Em frascos agitados, Valduga (2005) evidenciou que a concentração do extrato de malte e concentração de peptona foram as variáveis independentes que exerceram influência significativa ($p < 0,05$) positiva sobre a produção de células. No biorreator a concentração de peptona apresentou efeito significativo ($p < 0,1$) negativo no crescimento celular.

A elevação nas concentrações de peptona (0 a 6 g/L) e extrato de malte (0 a 6 g/L) proporcionou aumento na concentração de células (1,6 a 10,1 g/L) de *P. rhodozyma* em trabalho realizado por Orosa et al. (2004).

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

Para o microrganismo *X. dendrorhous* o pH exerceu influência significativa no crescimento celular, onde a concentração de células variou de 11,6 g/L a 17,3 g/L (HU et al., 2006). Em estudo sobre os tipos de cultivo de *X. dendrorhous*, Liu & Wu (2007) obtiveram para o processo em batelada uma densidade celular de 9,1 g/L, nos 2 estágios controlados verificou-se 15,2 g/L e nos 2 estágios otimizados 16,7 g/L. Uma comparação da produção de *H. pluvialis* nos biorreatores de coluna de bolha e *airlift* foi realizada por Kaewpintong et al. (2007). Os resultados obtidos demonstraram que o microrganismo apresentou maior densidade celular e taxa de crescimento específico ($79,5.10^4$ cel/mL e $0,45$ d⁻¹) para o cultivo em *airlift* quanto comparado com coluna de bolha ($42. 10^4$ cel/mL e $0,36$ d⁻¹).

A Tabela 10 apresenta a matriz no planejamento fatorial completo 2^3 com as respostas nitrogênio consumido, pH final e glicose consumida.

Tabela 10 Matriz do planejamento experimental completo 2³ (valores reais e codificados) com as respostas pH final, glicose e nitrogênio consumidos

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas		
	X ₂	X ₇	X ₅	Nitrogênio consumido (g/L)	Glicose consumida (g/L)	pH final
1	0,5 (-1)	15 (-1)	40 (-1)	4,05	19,63	3,59
2	0,5 (-1)	15 (-1)	80 (1)	0,98	61,52	3,52
3	0,5 (-1)	35 (1)	40 (-1)	8,61	24,86	3,52
4	0,5 (-1)	35 (1)	80 (1)	2,81	65,71	3,53
5	1,5 (1)	15 (-1)	40 (-1)	0,81	18,27	3,66
6	1,5 (1)	15 (-1)	80 (1)	3,68	60,37	3,67
7	1,5 (1)	35 (1)	40 (-1)	6,85	24,11	3,59
8	1,5 (1)	35 (1)	80 (1)	8,76	64,84	3,56
9	1,0 (0)	25 (0)	60 (0)	6,87	41,25	3,60
10	1,0 (0)	25 (0)	60 (0)	4,40	41,74	3,65
11	1,0 (0)	25 (0)	60 (0)	3,35	43,65	3,60

*X₂ = aeração (vvm); X₅ = glicose (g/L); X₇ = peptona (g/L)

Os ensaios 3, 7, 8 e 9 apresentaram os maiores consumos de nitrogênio do meio de cultivo, sendo estes meios constituídos de 35 g/L de peptona. Em relação ao consumo de glicose, o máximo consumo foi observado nos pontos 2, 4, 6 e 8, os quais apresentavam o maior nível de glicose investigado (80 g/L). Nos pontos 4 e 8, onde o consumo de glicose foi alto, obtiveram-se as menores concentrações de carotenóides totais, 950,27 µg/L e 725,07 µg/L, respectivamente. Em relação ao pH final, não foi observada variação considerável nos resultados após 100 h de cultivo.

Segundo Garbayo et al. (2003), em muitos microrganismos a carotenogênese é regulada por fatores ambientais, tais como a disponibilidade de nitrogênio. Além disso, a taxa de carbono:nitrogênio tem papel importante na síntese de metabólitos secundários, determinando o tipo dos metabólitos sintetizados e extensão da produção.

No cultivo de *G. fujikuroi* por Garbayo et al. (2003), a adição de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo tanto para o micélio livre quanto imobilizado, provocou a inibição da produção de carotenóides. Foi observado crescimento celular, porém a produção

de pigmento depende estritamente da limitação de nitrogênio no meio de cultura, sendo assim, os carotenóides funcionam como reguladores metabólicos no micélio.

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para nitrogênio consumido. Das variáveis independentes analisadas, a peptona apresentou efeito significativo ($p < 0,1$) sobre a concentração de nitrogênio consumido. Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância.

Tabela 11 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial completo 2^3 para nitrogênio consumido

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média*	4,65	0,55	8,53	0,0135
(1)Aeração	0,46	0,64	0,71	0,5498
(2)Peptona*	2,19	0,64	3,42	0,0757
(3)Glicose	-0,51	0,64	-0,80	0,5083
Interação 1 x 2	0,59	0,64	0,92	0,4536
Interação 1 x 3	1,71	0,64	2,67	0,1164
Interação 2 x 3	-0,46	0,64	-0,72	0,5463

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,1$)

O consumo de nitrogênio foi influenciado significativa ($p < 0,1$) e positivamente somente pela concentração de peptona.

A Equação 16 apresenta o modelo codificado que descreve a resposta nitrogênio consumido em função das variáveis independentes analisadas (aeração, concentração de glicose e concentração de peptona), dentro da faixa estudada. A análise de variância (Tabela 12) forneceu o coeficiente de correlação 0,95 e o F calculado 2,62 vezes superior ao valor tabelado, os quais permitiram a validação do modelo apresentado na equação 16.

Tabela 12 Análise de variância para nitrogênio residual do planejamento fatorial completo 2³

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	38,31	1	38,31	8,93
Resíduo	38,63	9	4,29	
Falta de Ajuste	32,09	7		
Erro Puro	6,54	2		
Total	76,94	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de correlação R = 0,95; F_{tab, 90%} = 3,36

A equação 16 apresenta o modelo codificado para a resposta nitrogênio consumido em função das variáveis estudadas (aeração, concentração de peptona, concentração de glicose).

$$\text{Nitrogênio consumido} = 4,65 + 2,19.X_7 \quad (16)$$

Onde: Nitrogênio consumido (g/L), X₇ = peptona

A Tabela 13 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a o consumo de glicose. As variáveis independentes concentração de peptona e concentração de glicose apresentaram efeito significativo (p<0,1) sobre a concentração de glicose consumida. Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 13 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo 2³, para glicose consumida (g/L)

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média*	42,36	0,38	110,85	0,000081
(1)Aeração	-0,51	0,44	-1,14	0,3692
(2)Peptona*	2,46	0,44	5,50	0,0314
(3)Glicose*	20,69	0,44	46,19	0,0004
Interação 1 x 2	0,11	0,44	0,25	0,8256
Interação 1 x 3	0,009	0,44	0,02	0,9844
Interação 2 x 3	-0,30	0,44	-0,67	0,5692

*fatores estatisticamente significativos (p<0,1)

A equação 17 apresenta o modelo codificado que descreve a resposta glicose consumida (g/L) em função das variáveis peptona, glicose e aeração, na faixa estudada. A análise de variância (Tabela 14) resultou em um coeficiente de correlação (0,99) e o F calculado de 709 vezes superior ao valor tabelado, os quais permitiram a validação do modelo apresentado na equação 17.

Tabela 14 Análise de variância para a glicose residual do planejamento fatorial completo 2³

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F calculado
Regressão	3475,95	2	1737,98	2216,8899
Resíduo	6,27	8	0,78	
Falta de Ajuste	3,06	6		
Erro Puro	3,21	2		
Total	3482,22	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Coeficiente de correção R = 0,99; F_{tab, 90%} = 3,13

A equação 17 apresenta o modelo codificado para a resposta glicose consumida das variáveis estudadas (aeração, concentração de peptona, concentração de glicose) do planejamento fatorial completo 2³.

$$\text{Glicose consumida} = 42,36 + 4,93.X_7 + 41,40.X_5 \quad (17)$$

Onde: Glicose consumida (g/L), X₇ = peptona, X₅ = glicose

Com o modelo empírico validado, construiu-se a superfície de resposta e a curva de contorno para glicose consumida (g/L) do planejamento fatorial completo, apresentadas na Figura 20.

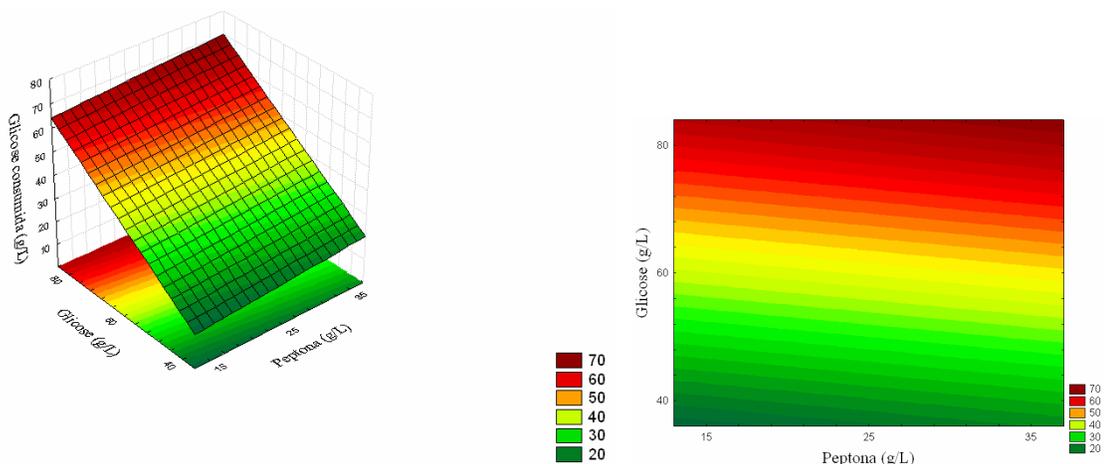


Figura 20 Superfície de resposta e curva de contorno para glicose consumida (g/L) em função da concentração de glicose e peptona

Conforme observado na Figura 20, o maior consumo de glicose dá-se nas maiores concentrações de glicose e peptona. Em frascos agitados (VALDUGA, 2005), o consumo de glicose pelas leveduras foi influenciado não somente pelo efeito linear da concentração de peptona, mas também pelo efeito de segunda ordem da concentração de peptona e efeitos linear e quadrático da concentração de glicose. O maior consumo de glicose foi encontrado nas menores concentrações de peptona e extrato de malte.

A concentração de glicose foi estudada por Fang & Wang (2002), o aumento da concentração desta (15 a 45 g/L) proporcionou maior produção de astaxantina (concentração máxima de 11,6 mg/L). A glicose foi consumida quase que completamente durante a fermentação (72 h), sendo que nas primeiras 24 h ocorreu uma queda brusca na concentração de glicose no meio de cultivo e rápida produção de carotenóides. Na fermentação com *Bacillus circulans* e *X. dendrorhous*, a indução da enzima lítica na modificação da membrana celular da levedura foi inibida pela alta concentração de glicose, os efeitos dos altos níveis de açúcar na cultura mista podem ser explicados pela repressão catabólica do açúcar residual ou inibição do metabolismo oxidativo. Segundo Yamane et al. (1997) a produção de astaxantina por *X. dendrorhous* é elevada nas altas taxas iniciais de carbono:nitrogênio no meio, porém o crescimento celular pode ser inibido em alta concentração de glicose.

Na otimização de Liu & Wu (2007), a glicose adicionada ao meio de cultivo foi completamente consumida durante as primeiras 48 h de fermentação, em seguida, adicionou-se novamente glicose ao meio de cultivo a qual foi novamente consumida completamente até 72 h de fermentação. A produção de astaxantina é estudada em batelada alimentada devido ao efeito Crabtree, onde a glicose excessiva provoca a formação de etanol e ácidos orgânicos.

4.2.3 Cinética do processo fermentativo e parâmetros estequiométricos

A Figura 21 apresenta as cinéticas de crescimento, consumo de substrato (glicose e nitrogênio), evolução do pH e produção de carotenóides em meio sintético no biorreator para o ponto maximizado (ensaio 6) do planejamento fatorial completo 2³.

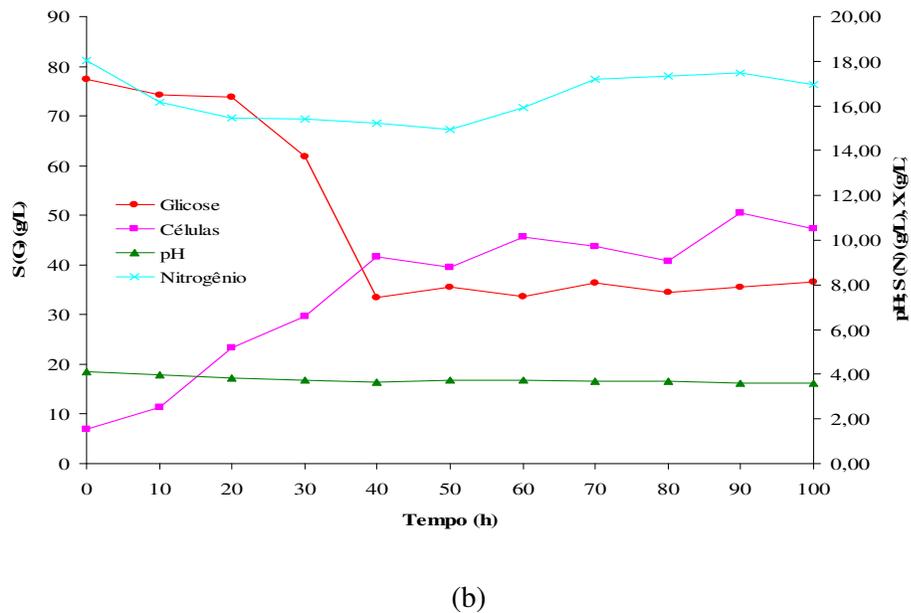
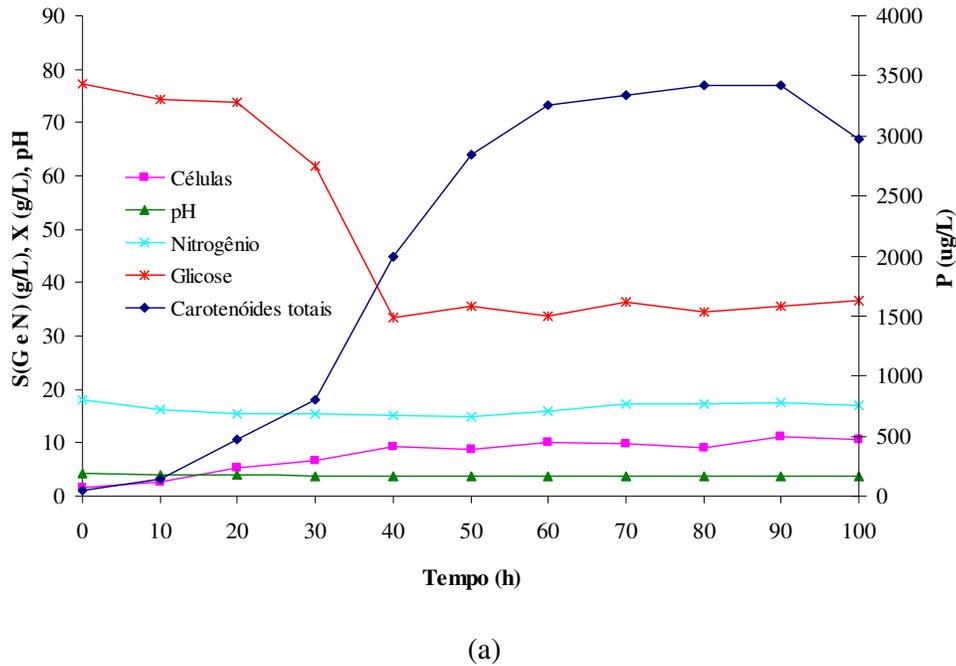


Figura 21 Cinética da bioprodução de carotenóides por *S. salmonicolor* (CBS 2636) para as condições maximizadas (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte) (a) geral (b) detalhe

Segundo a análise da Figura 21 (a), a concentração máxima de carotenóides totais foi obtida em aproximadamente 90 h do início da biorreação (3426,0 µg/L), sendo que a partir de 60 h o aumento da concentração de carotenóides é baixo. A Figura 22 apresenta o aspecto dos carotenóides extraídos na cinética de produção do corante.

Com aproximadamente 40 h de biorreação, iniciou-se a fase estacionária de crescimento celular e, o consumo de glicose permaneceu constante até o final da produção. Após 50 h de bioprodução, ocorreu a desaceleração da produção de carotenóides totais e a concentração de nitrogênio apresentou um acréscimo. Este aumento pode ter sido gerado devido à lise celular e proteólise sob condições de estresse. Pode-se verificar ainda que houve menor consumo de nitrogênio (7 %) quando comparado ao consumo de glicose (53 %). O pH apresentou pequena variação (4,13 a 3,61) no decorrer do processo.

Ao final da bioprodução, ainda havia elevadas concentrações de glicose e nitrogênio no meio de cultivo, aproximadamente 35 g/L e 17 g/L, respectivamente, ou seja, o consumo de glicose foi de aproximadamente 53 % e o de nitrogênio de 7 %, indicando que não ocorreu carência de carbono e nitrogênio no meio. Em frascos agitados nas condições 25 °C, 180 rpm, 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona, Valduga (2005) observou um consumo de glicose de 50 %, sendo este consumo semelhante ao observado no biorreator.

Na fase exponencial de crescimento, o consumo de glicose está relacionado ao crescimento celular, onde foi observado maior consumo da fonte de carbono. No entanto, na fase estacionária a concentração de glicose permaneceu inalterada, assim não houve consumo da fonte de carbono (glicose). Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Ramírez et al. (2006), onde entre 6 e 48 h ocorreu o consumo máximo de açúcares.

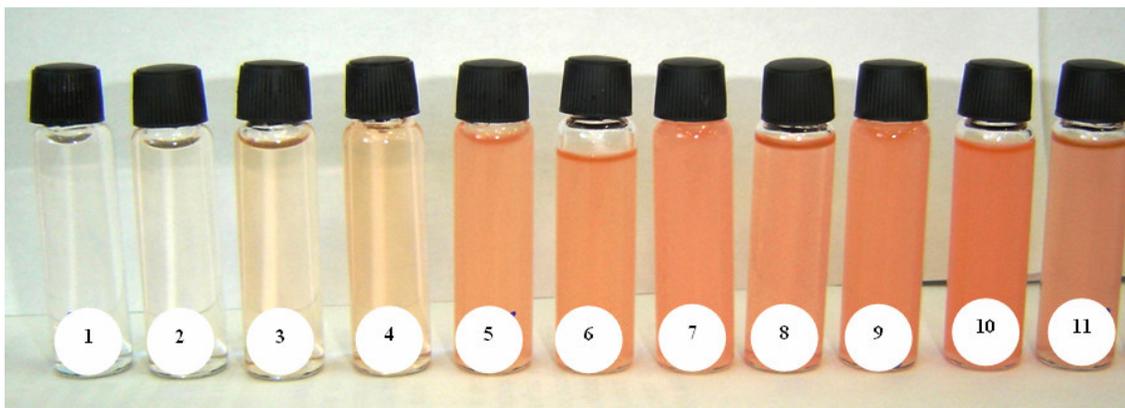


Figura 22 Aspecto visual dos pigmentos extraídos a cada 10 h de biorreação na cinética de produção de carotenóides nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 100 h de bioprodução

Na adição de NaNO_3 no meio de cultivo de *H. pluvialis*, Orosa et al. (2004) observaram que enquanto NaNO_3 permaneceu disponível para as culturas, as concentrações de clorofilas e carotenóides totais permaneceram em níveis constantes. Quando houve deficiência de nitrogênio, ocorre rápido declínio da produção de clorofila, enquanto que a produção de carotenóides ocorreu do início ao fim do desenvolvimento da cultura. Além disso, a concentração máxima de carotenóides foi obtida com deficiência de nitrogênio.

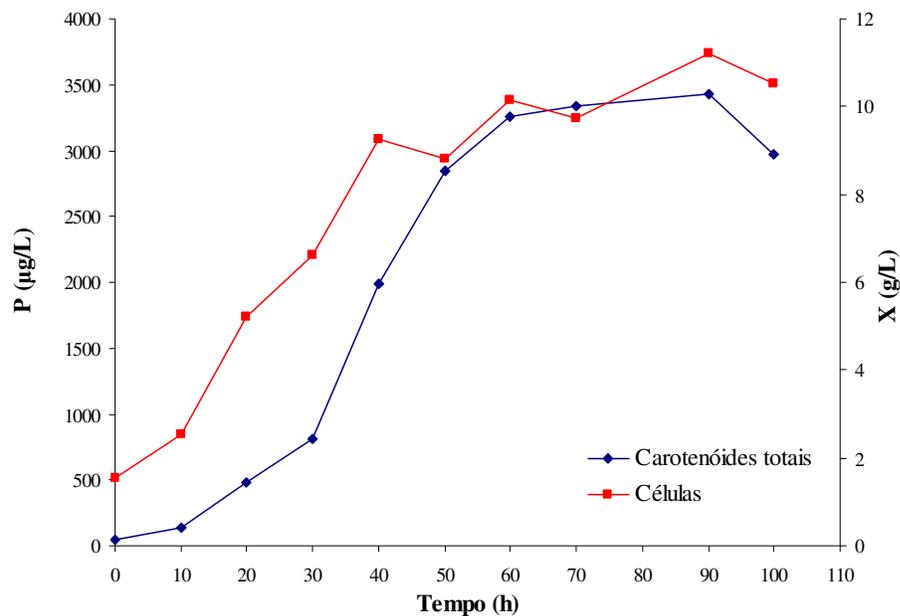


Figura 23 Produção de carotenóides com o crescimento celular no ponto maximizado do planejamento completo 2^3 em biorreator durante 100 h de cultivo nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte

A Figura 23 mostra que a bioprodução de carotenóides apresentou formação de produto parcialmente associada ao crescimento celular, sendo que as máximas concentrações de células (11,2 g/L) e carotenóides totais (3426 µg/L) foram observadas em 90 h de bioprodução (fase estacionária), simultaneamente. Após 40 h de biorreação, iniciou-se a fase estacionária de crescimento celular, enquanto que ainda era observado um aumento na formação de carotenóides. Somente após 60 h de bioprodução foi evidenciada fase estacionária de formação de produto.

O crescimento da levedura *R. mucilaginosa* (AKSU & EREN, 2005) em meio com 15 g/L de glicose foi fortemente associado ao crescimento celular. Em meio com 15 g/L da sacarose, a produção de carotenóides foi quase que paralela ao crescimento celular. No

entanto em meio contendo 13,2 g/L de lactose não foi observada nenhuma relação de crescimento paralelo entre células e pigmentos.

Em estudo de Razavi & March (2006), a produção de carotenóides foi aproximadamente paralela ao crescimento celular da levedura *S. ruberrimus*, onde a produção máxima de pigmentos foi geralmente observada no final da fase exponencial de crescimento. O mesmo comportamento foi observado por Tinoi et al. (2005), onde a produção de pigmentos foi paralela ao crescimento celular de *R. glutinis*.

As Figuras 24 e 25 apresentam a produtividade em carotenóides (P_{car}), e a evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em células (P_x) no decorrer da biorreação, respectivamente.

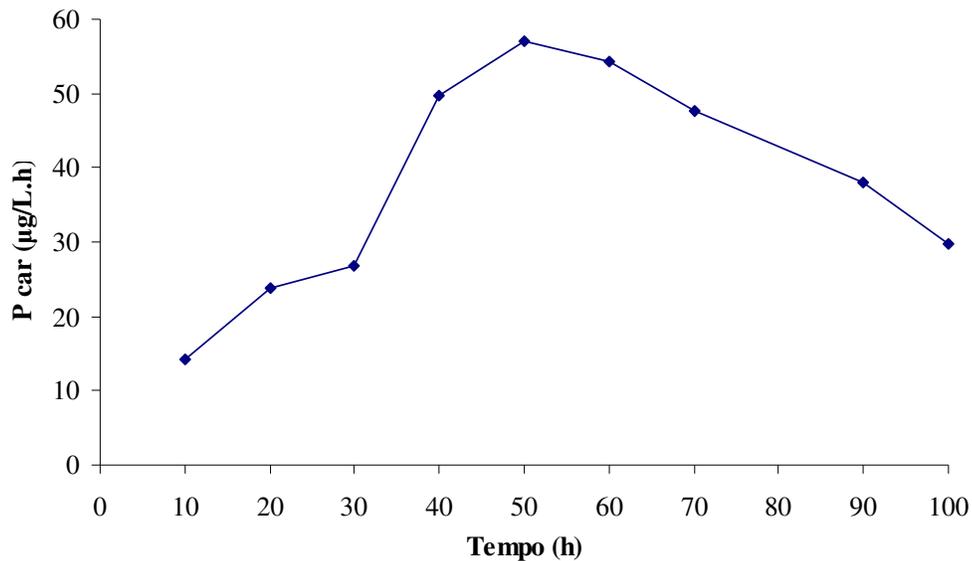


Figura 24 Produtividade em carotenóides ao longo da bioprodução no ponto maximizado do planejamento completo 2^3 em biorreator durante 100 h de biorreação nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte

Observa-se que até 50 h ocorreu aumento da produtividade, obtendo-se um máximo de 56,9 $\mu\text{g/L.h}$. A partir deste ponto ocorreu decréscimo da produtividade até o final da biorreação. Em frascos agitados com meio sintético, Valduga (2005) obteve uma produtividade máxima em aproximadamente 30 h de bioprodução, com valor referente a 16 $\mu\text{g/L.h}$.

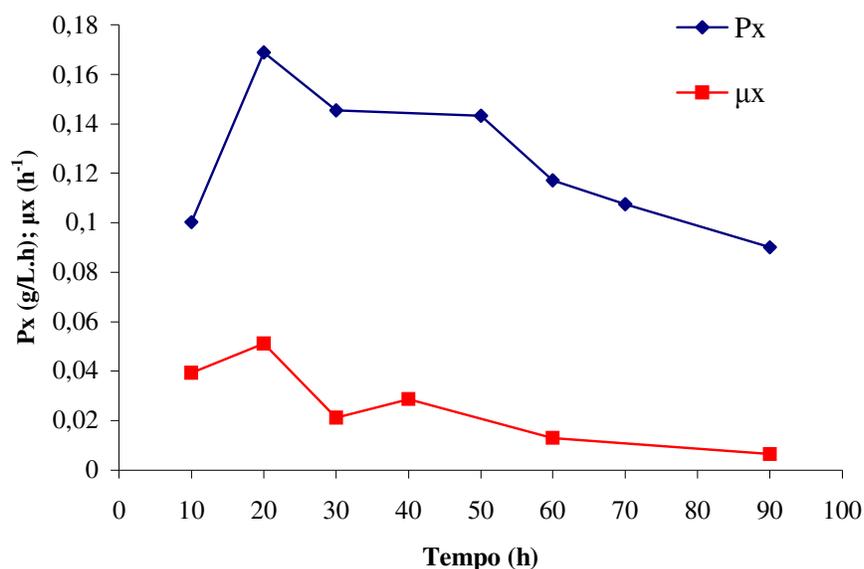


Figura 25 Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em células (P_x) durante 100 h de biorreação nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte

A Tabela 15 apresenta os principais parâmetros cinéticos para a *S. salmonicolor* calculados para a fase linear de bioprodução observada. No ponto maximizado, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para a *S. salmonicolor* é igual a $0,051 h^{-1}$ (Figura 25). A produtividade em células máxima (P_x) é de $0,19 g/L.h$ (Figura 25), e a produtividade em carotenóides totais máxima é de $56,9 \mu g/L.h$ (Figura 24).

Tabela 15 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em meio sintético para o ponto maximizado no planejamento fatorial completo 2^3 nas condições: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte, 100 h de biorreação

Parâmetro	Valor obtido no período de 0 – 40 h
$Y_{P/N}$ ($\mu\text{g/g}$)	1516,1
$Y_{X/N}$ (g/g)	6,28
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$)	41,36
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,15
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	238
P_x (g/L.h)	0,19
μ_x (h^{-1})	0,045

Comparando-se os valores obtidos em biorreator (Tabela 15) com os obtidos em frascos agitados com meio sintético (Valduga, 2005), não se observou a presença de três fases (linear, desaceleração, estacionária). Em frascos agitados (Valduga, 2005) o fator $Y_{X/S}$ na primeira fase foi de 1,2 g/g, segunda fase 0,03 g/g e terceira fase 0,03 g/g. A diferenciação dos fatores de conversão evidencia o comportamento distinto do crescimento celular e consumo de substratos em frascos agitados e no biorreator.

O fator $Y_{P/X}$ de 238 $\mu\text{g/g}$ obtido para o biorreator é inferior ao observado por Valduga (2005) em frascos agitados, onde foi obtida uma conversão 572,2 $\mu\text{g/g}$ na segunda fase de cultivo (desaceleração). Segundo Liu et al. (2006) o aumento no rendimento específico de carotenóides é indicativo de uma ampliação na biossíntese de carotenóides nas células de levedura. Possivelmente este comportamento esteja relacionado a mudanças no metabolismo e estresse celular.

Para o fator de conversão $Y_{P/N}$ observou-se maior conversão de nitrogênio em carotenóides (1516,1 $\mu\text{g/g}$) quando relacionado à conversão de glicose em carotenóides (41,3 $\mu\text{g/g}$), sendo que o fator de conversão obtido para glicose (carbono) pode ter sido inferior ao do nitrogênio, devido ao consumo de nitrogênio ter sido inferior ao consumo de glicose.

A adição de nitrogênio inorgânico (nitrato) no meio de cultivo de *H. pluvialis* (Orosa et al., 2004) promoveu o aumento da taxa de crescimento celular. Sem a adição de nitrato observou μ de 0,12 h^{-1} , com a adição de 0,75 g/L de NaNO_3 obteve-se uma taxa específica de

crescimento celular de $0,51 \text{ h}^{-1}$. No entanto, a adição de acetato provocou redução nas taxas de crescimento celular, de $0,51 \text{ h}^{-1}$ (sem adição de acetato) para $0,28 \text{ h}^{-1}$ com a adição de 2 % de acetato ao meio de cultivo. A adição de 0,25 % de malonato no meio de cultura promoveu um aumento de $0,44 \text{ h}^{-1}$ para $0,51 \text{ h}^{-1}$, em concentrações superiores deu-se a inibição do crescimento celular.

No cultivo de *R. mucilaginosa* por Aksu & Eren (2005), avaliou-se o efeito do pH inicial nas taxas específicas de crescimento celular (μ) e formação de produto (v). Observou-se que com a variação de pH de 3,0 a 7,0 houve elevação dos valores de μ e v , sendo que após pH 7,5 uma queda brusca das taxas foi evidenciada. No entanto, o rendimento de produto ($Y_{P/X}$) máximo (14,4 mg/g) foi obtido em pH 3,0. Na avaliação da temperatura sobre o crescimento celular e produção de carotenóides, os parâmetros μ ($0,25 \text{ h}^{-1}$) e v ($0,72 \text{ mg/g.h}$) foram mais elevados a 30°C , sendo que em 35°C uma rápida queda foi observada, devido a desnaturação do sistema enzimático do microrganismo. No estudo da aeração, o aumento de 0 a 2,4 vvm proporcionou aumento das taxas μ e v , bem como o rendimento de produto (19,8 mg/g). Para o estudo da fonte de carbono, a elevação na concentração de glicose de 0 a 20 g/L, proporcionou maiores taxas específicas de crescimento celular (0 a $0,28 \text{ h}^{-1}$) e formação de produto (0 a $0,8 \text{ mg/g.h}$), além de elevação no rendimento de produto (7,9 a 13,9 mg/g).

Em trabalho semelhante, porém no cultivo do *R. glutinis*, Aksu & Eren (2007) observaram que as taxas específicas de crescimento celular (μ) e formação de produto (v) decresceram bruscamente a partir de pH 6,0, sendo que em pH 6,0 obtiveram-se maiores concentrações celular (4,9 g/L), carotenóides totais (63,4 mg/L), $Y_{P/X}$ (13,5 mg/g) e $Y_{P/S}$ (4,2 mg/g). A temperatura de 30°C proporcionou maior taxa de crescimento celular ($0,24 \text{ h}^{-1}$) e $Y_{P/S}$ (4,2 mg/g), porém a taxa máxima de produção ($0,82 \text{ mg/g.h}$) ocorreu a 35°C e o rendimento de produto ($Y_{P/X} = 18,5 \text{ mg/g}$) em 25°C . A aeração e a concentração de glicose apresentaram comportamento semelhante à levedura *R. mucilaginosa*.

A suplementação do meio de cultivo de *P. rhodozyma* com nitrato de potássio proporcionou aumento no rendimento de células $Y_{X/S}$ (0,42 g biomassa/g xilose consumida) quanto comparados aos dados da literatura (0,19 – 0,30 g biomassa/g xilose consumida). Na otimização do meio com fontes de nitrogênio orgânico, obteve-se aumento no rendimento de células ($Y_{X/S} = 0,5$), este valor é 19 % maior que os dos ensaios não otimizados (PARAJÓ et al., 1998).

A forte influência do pH nos rendimentos específicos de produto e células foi apresentada por Hu et al. (2006). Em pH inicial 5,0 e não controlado, obtiveram-se os

menores rendimentos $Y_{X/S}$ (0,18 g/g), $Y_{P/S}$ (0,24 mg/g), porém o menor rendimento em $Y_{P/X}$ (1,10 mg/g) foi encontrado para pH controlado 6,0. Os maiores rendimentos em produto ($Y_{P/X} = 1,74$ mg/g e $Y_{P/S} = 0,36$ mg/g) foram encontrados no ensaio com pH controlado em 6,0 de 0 h até 80 h de bioprodução, e controlado em 4,0 até o final do processo.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Através de técnica de planejamento de experimentos estudou-se a bioprodução de carotenóides por *S. salmonicolor* CBS 2636 utilizando meio sintético em biorreator. Inicialmente realizou-se um *screening* de variáveis na produção de carotenóides, seguido de um planejamento fatorial completo visando a maximização da bioprodução. Em seguida, estudou-se a cinética do bioprocessos e obtiveram-se os parâmetros estequiométricos de crescimento celular e produção de carotenóides. A seguir são apresentadas as principais conclusões do trabalho:

1. O teor máximo de carotenóides totais no planejamento fatorial completo 2^3 foi de 3313,6 $\mu\text{g/L}$ obtido nas condições: concentração de glicose de 80 g/L, concentração de peptona de 15 g/L, concentração de extrato de malte de 5 g/L, aeração de 1,5 vvm, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C e pH inicial 4,0;
2. Na cinética da bioprodução do ponto maximizado do planejamento completo 2^3 , obteve-se a máxima concentração de carotenóides totais (3425,9 $\mu\text{g/L}$) com aproximadamente 90 h de bioprodução, ressaltando-se que a partir de 60 h o aumento da concentração de carotenóides é baixo;
3. A bioprodução de carotenóides pela levedura *S. salmonicolor* CBS 2636 apresenta formação de carotenóides parcialmente associada ao crescimento celular;
4. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *S. salmonicolor* em biorreator é de 0,051 h^{-1} com uma produtividade máxima em células de 0,19 g/L.h;
5. A produtividade máxima em carotenóides (56,9 $\mu\text{g/L.h}$) é observada com 50 h de fermentação;
6. Comparando-se a produção de carotenóides em frascos agitados e no biorreator, obteve-se neste trabalho um aumento de 3,3 vezes na concentração de carotenóides totais;
7. A agitação e a aeração proporcionaram melhor homogeneidade no meio de cultura, e conseqüentemente maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

1. Otimizar a bioprodução de carotenóides em meio sintético por *S. salmonicolor* (CBS 2636) em biorreator;
2. Identificar e caracterizar os carotenóides produzidos por *S. salmonicolor* (CBS 2636), por cromatografia líquida (CLAE), com o objetivo de verificar o caminho biossintético da levedura;
3. Investigar a possibilidade de utilização de substratos agroindustriais na fermentação em biorreator tais como, melaço de cana-de-açúcar, soro de leite, água de maceração de milho, hidrolisado de levedura, e outros;
4. Avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (orgânico e inorgânico) na bioprodução de carotenóides em frascos agitados e posteriormente em biorreator;
5. Avaliar a potencialidade de agentes químicos estimulantes da carotenogênese (ácido mevalônico, difenilamina, ácido acético, β -ionona e alguns aminoácidos) em frascos agitados e posteriormente em biorreator;
6. Realizar fermentação com pH controlado e obter parâmetros estequiométricos verificando a possibilidade de alterações no pH durante a fermentação;
7. Caracterizar as condições de transferência de oxigênio e seus efeitos sobre o crescimento de *S. salmonicolor* (CBS 2636) e produção de carotenóides em biorreator;
8. Avaliar os efeitos da luminosidade sobre o crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) e produção de carotenóides;
9. Cultivar *S. salmonicolor* (CBS 2636) em batelada alimentada e/ou cultivo contínuo, e avaliar a possibilidade de reciclo de células, a fim de aumentar o rendimento de carotenóides totais;
10. Avaliação cinética do processo em batelada;
11. Modelagem matemática do processo otimizado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

BHOSALE, P; GRADE, R. V. β -carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 327 – 332, 2001.

BOROWITZKA, L. J; BOROWITZKA, M. A. β -carotene production with algae. **In**: Vandamme, J. E. (ed). *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*, Elsevier Applied Science: New York, p. 15 – 26, 1989.

BOTELLA-PAVÍA, P; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 369 – 381, 2006.

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

BUZZINI, P. et al. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 687 – 692, 2005.

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

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

CHEN, D. et al. Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1773 – 1778, 2006.

CHOUDHARI, S. M. et al. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of β -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896. **Bioresource Technology**, *in press*, 2007.

CHOUDARI, S. M; SINGHAL, R. Media optimization for the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 722 – 730, 2008.

DAVIES, B. H. Carotenoid. **In:** Goodwin, T. W. (ed), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**, p. 38 – 165. Academic Press, New York, 1976.

DAVOLI, P. et al. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 4, p 392 – 397, 2004.

DAVOLI, P; WEBER, R. W. S. Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus*. **Mycologist**, v. 16, p. 102 - 108, 2002.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R. et al. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 209 – 214, 2004.

DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 389 – 406, 2005.

FANG, T. J; CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p. 175-181, 1996.

FANG, T. J; WANG, J.-M. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1235 – 1245, 2002.

FAZELI, M. R. et al. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from Urmia salt lake, north of Iran. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2453 – 2456, 2006.

FEOVILA, G. I. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. **Applied Biochemical Bioengineering**, v. 30, p. 143 – 153, 1994.

FONTANA, J. D. et al. Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 121 – 125, 1996.

FRASER, P. D; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2004.

FRENGOVA, G. et al. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1001 – 1006, 1995.

- FRENGOVA, G. et al. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 888 – 894, 1994.
- GARBAYO, I. et al. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 629 – 634, 2003.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 81 – 90, 2005.
- GONZÁLEZ, M. A. et al. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. **Biological Research**, v. 36, n. 3 – 4, 2003.
- GOODWIN, T. W. The Biochemistry of the carotenoids: Biosynthesis.v.1 , p. 578 – 602, Chapman and Hall London, 1981.
- GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**, New York, Published by Van Nostrand Reinhold, 1991.
- HAARD, N. F. Astaxanthin formation by yeast on molasses. **Biotechnology Letter**, v. 10, p. 609-614, 1988.
- HAYMAN, E. P. et al. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v.120, p. 1339-1343, 1974.
- HEJAZI, M. A. et al. Milking microalga *Dunaliella salina* for β -carotene production in two-phase bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 5, p. 475 – 481, 2004.
- HU, Z-C. et al. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 586-590, 2006.
- JONHSON, E. A. et al. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 115, p. 173 – 183, 1979.
- JONHSON, E. A; GIL-HWAN, AN. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Review in Biotechnology**, v. 11, p. 297 – 326, 1991.
- JONHSON, E. A; GIL-HWAN, AN. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Microbiology and Serology**, v. 57, p. 191 – 202, 1990.
- JOHNSON, E. A; SCHROEDER W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18374 – 18379, 1995.
- KAERPINTONG, K. et al. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. **Bioresource technology**, v. 98, p. 288 – 295, 2007.

- LI, Z. et al. Cadmium-resistance in growing *Rhodotorula* sp. Y11. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1339 – 1344, 2008.
- LIBKIND, D. et al. Mycosporines in carotenogenic yeasts. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 749 – 754, 2005.
- LIU, Y. S; WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 182 – 189, 2007.
- LIU, Y.-S. et al. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 331 – 335, 2006.
- LÓPEZ, M. C. G.-M. et al. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 329 – 342, 2006.
- LÓPEZ-NIETO, M. J. et al. Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 153 – 159, 2004.
- MALDONADE, I. R. **Produção de Carotenóides por Leveduras**. Campinas, 2003. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- MALDONADE, I. R. et al. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v. 107, p. 145 – 150, 2008.
- MALDONADE, I. R. et al. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 65 – 70, 2007.
- MALISORN, C; SUNTORNSUK, W. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine. **Bioresource Technology**, in press, 2007.
- MANTZOURIDOU, F. et al. 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.
- MANTZOURIDOU, F. et al. Effect of oxygen transfer rate on β -carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in shake flask culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 687 – 694, 2005.
- MARASCO, E; SCHIMDT-DANNERT, C. Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, n. 3, p. 145 – 157, 2003.
- MARGALITH, P; MEYDAV, S. Some observations on the carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. **Phytochemistry**, v. 7, p. 765 – 768, 1968.
- MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.

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

MOISE, A. R. et al. Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in the metabolism of carotenoids. **TRENDS in Plant Science**, v. 10, n. 4, p. 178 – 184, 2005.

MORALES, E. et al. Pigment and protein production of the *cyanobacterium Anabaena* PCC 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. **Gayana Botánica**, v. 60, n. 2, 2003.

NIIZU, P. Y. **Fontes de Carotenóides Importantes para a Saúde Humana**. Campinas, 2003. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

OLIVIER, J; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543 – 555, 2000.

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

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

PARK, P. K. et al. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. **Separation and Purification Technology**, v. 53, p. 148 – 152, 2007.

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

RAMÍREZ, J. et al. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 259 – 268, 2001.

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

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

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

SANCHÉZ-CONTRERAS, A. et al. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 528 – 534, 2000.

SANDMANN, G; Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 4 – 12, 2001.

SARADA, R. et al. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7585 – 7588, 2006.

SARADA, R. et al. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 623 – 627, 2002.

SCHMIDT-DANNERT, C; MIJTS, B. N. Engineering of secondary metabolite pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 597 – 602, 2003.

SHIH, C. T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. **Lebensm.-Wiss. U.-Technology**, v. 29, p. 570-572, 1996.

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

SIMPSON, K. L. et al. Biosynthesis of yeast carotenoids. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 6, p. 1688 – 1694, 1964.

STARR, P. et al. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1003 – 1007, 1976.

SUN, N. et al. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 263 – 267, 2004.

SUTHERLAND, F. C. W. et al. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 975-980, 1996.

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

TRIPATHI, U. et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 197 – 199, 1999.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. Florianópolis, 2005. Tese de Doutorado em Engenharia Química – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

VALDUGA, E. et al. Optimization of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. **Food and Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-008-0066-x, 2008.

VÁZQUEZ, M; SANTOS, V. 3-Hydroxy-3',4'-didehidro- β - Ψ -carotene-4-one from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 181 – 182, 1998.

VERDOES, J. C. et al. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3728 – 3738, 2003.

WANG, W. et al. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 26 – 31, 2006.

WANG, S. -L. et al. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. 325 – 329, 2007.

YAMANE, Y-I. et al. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: Kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4471 - 4478, 1997.

YOKOYAMA, A; MIKI, W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 139 – 144, 1995.

ANEXO

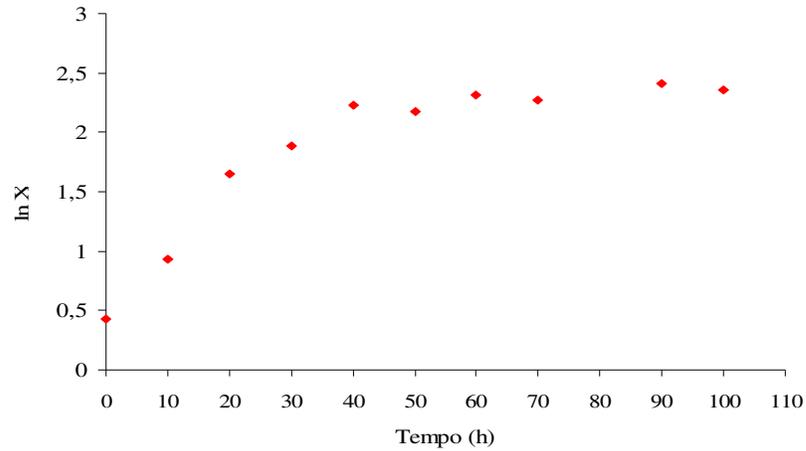


Figura 26 Linearização do crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

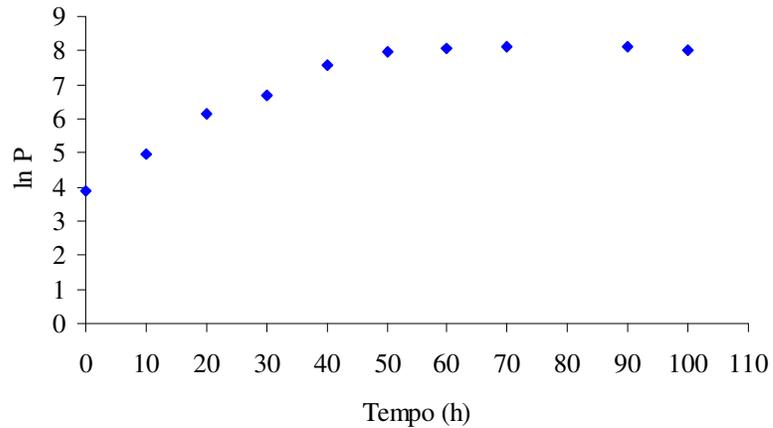


Figura 27 Linearização da produção de carotenóides pela levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

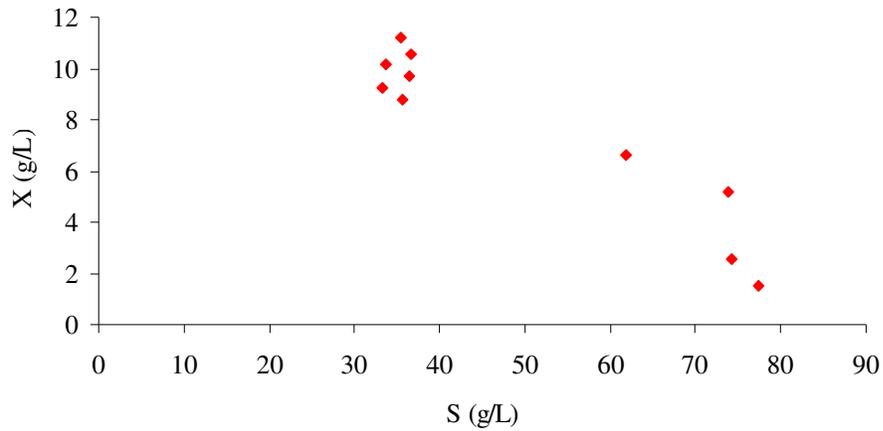


Figura 28 Determinação das fases de cultivo para a determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

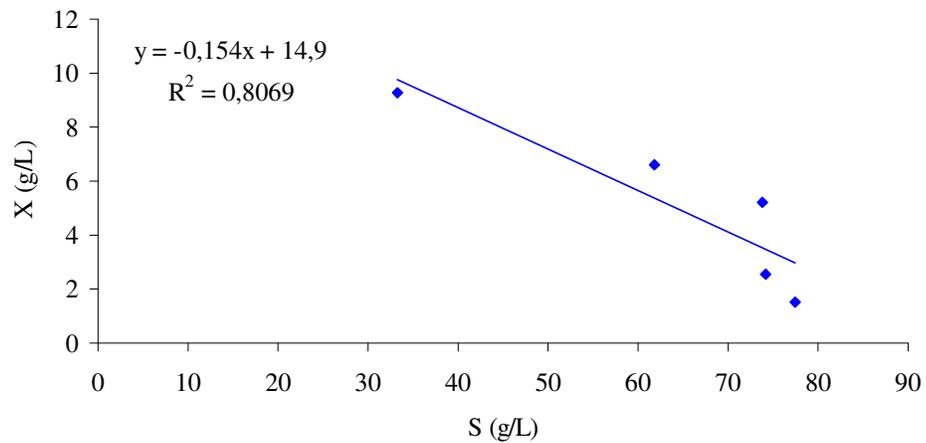


Figura 29 Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

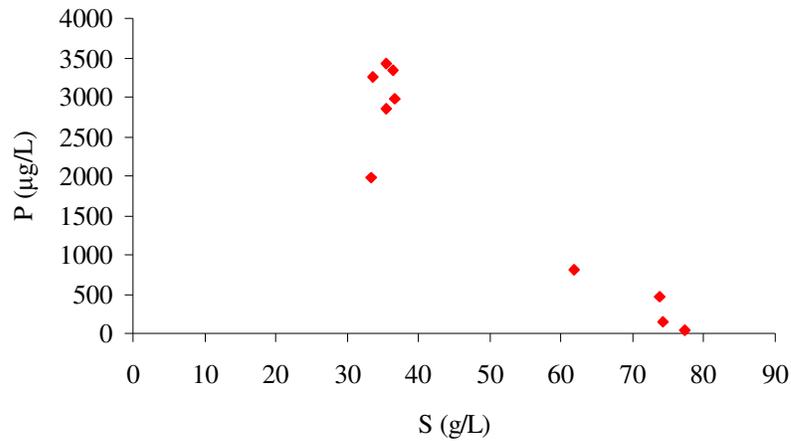


Figura 30 Determinação das fases de biorreação para a determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

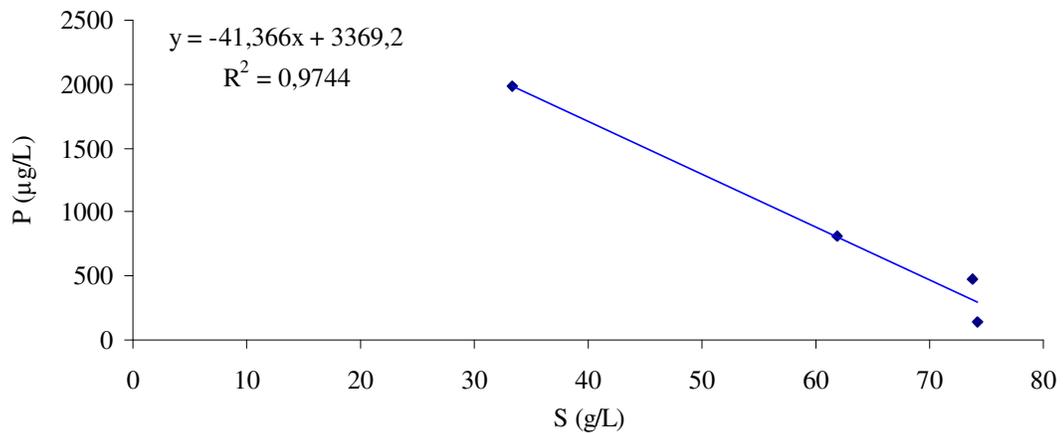


Figura 31 Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

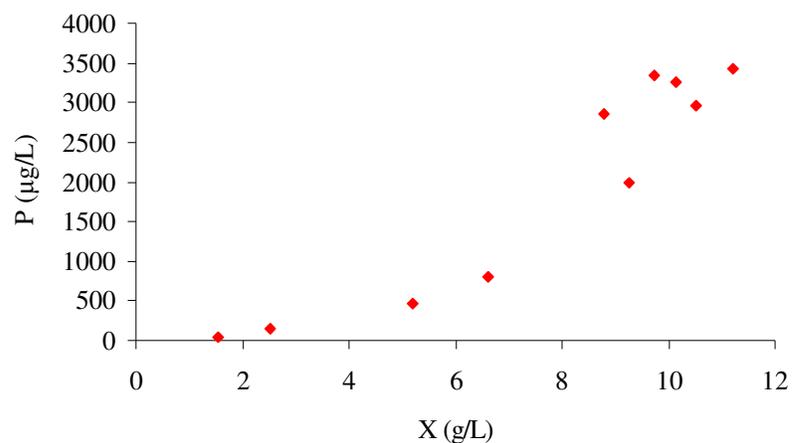


Figura 32 Determinação das fases de biorreação para a determinação do fator de conversão $Y_{P/X}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

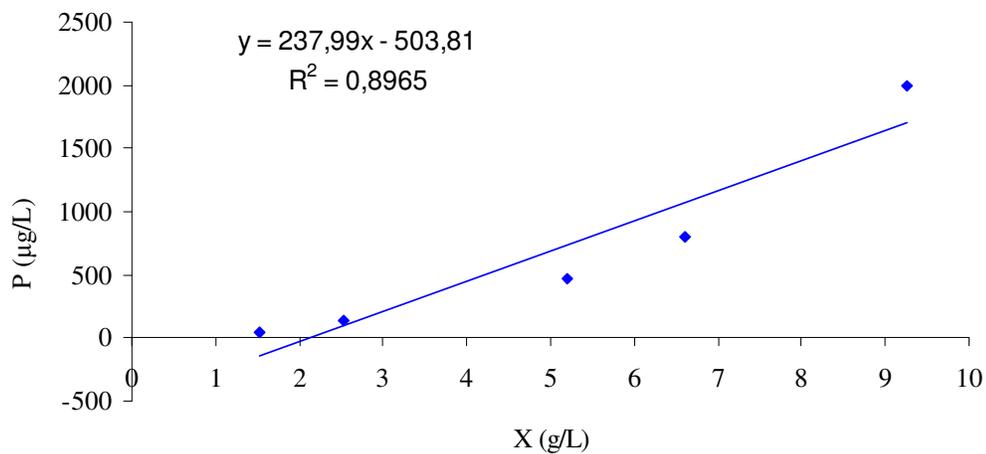


Figura 33 Determinação do fator de conversão $Y_{P/X}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

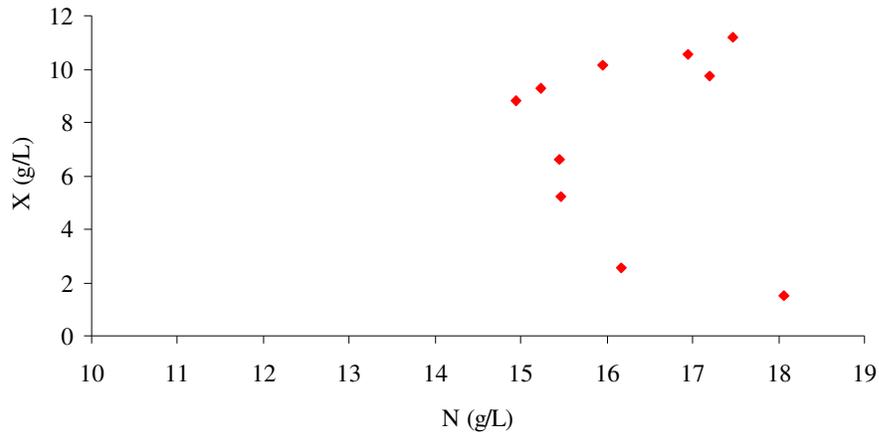


Figura 34 Determinação das fases de cultivo para a determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

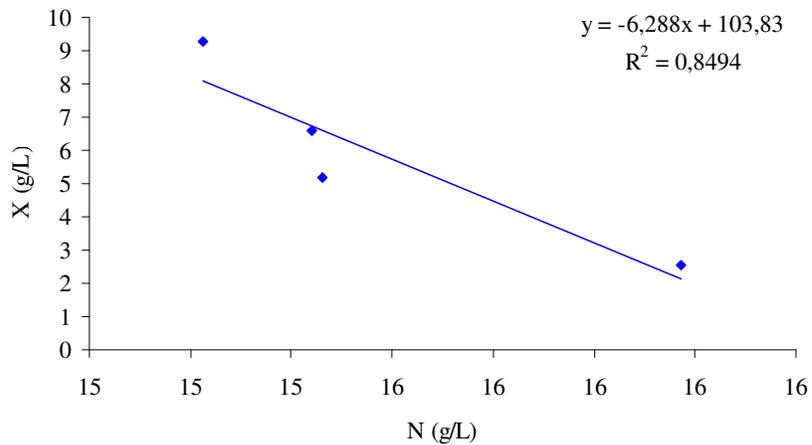


Figura 35 Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ para o ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

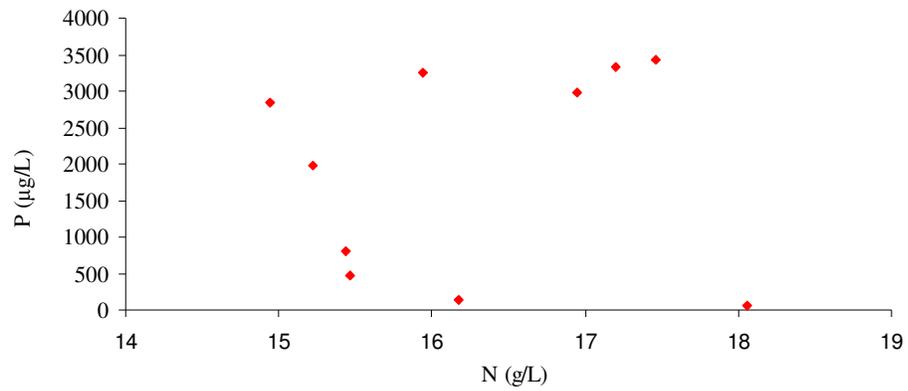


Figura 36 Determinação das fases de biorreação para a determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)

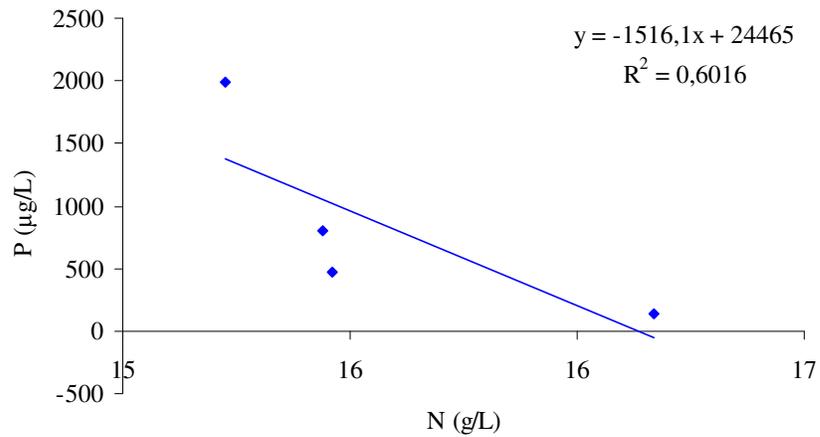


Figura 37 Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ no ponto maximizado do planejamento experimental completo 2^3 (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte)