

## PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES MICROBIANOS PELA LEVEDURA *Sporidiobolus pararoseus* UTILIZANDO COPRODUTOS

Whallans Raphael Couto Machado (UNESP) whallansfm@hotmail.com

Janaina Fernandes de Medeiros Burkert (FURG) jfmb@vetorial.net

**Resumo:** Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais distribuídos amplamente na natureza, em plantas, flores e micro-organismos, tendo como principais fontes de obtenção industrial a síntese química, extração de plantas e a produção biotecnológica, na qual vem despertando crescente interesse. Através de um delineamento composto central rotacional  $2^2$  foi possível estudar os efeitos da composição do meio de cultivo com glicerol bruto (5 a 10  $\text{g.L}^{-1}$ ) e água de maceração de milho (20 a 30  $\text{g.L}^{-1}$ ) a 25°C, 180 rpm por 168 h. A utilização de 9 a 10  $\text{g.L}^{-1}$  de glicerol bruto e 26 a 30  $\text{g.L}^{-1}$  água de maceração de milho de glicerol bruto alcançou a máxima produção em carotenoides de 640  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (126,83  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em 168 h, uma concentração celular de 6,8  $\text{g.L}^{-1}$ , produtividades em carotenoides e biomassa de 4,78  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (0,55  $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e 0,04  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Portanto, houve um ganho de aproximadamente 49% e 56% na produção de carotenoides volumétrica e específica, respectivamente, se comparado com o menor resultado de cada resposta. Dessa forma demonstrando o potencial da *Sporidiobolus pararoseus* como fonte de carotenoides microbianos utilizando coprodutos agroindustriais.

**Palavras-chave:** carotenoides, coprodutos, levedura.

## PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY MICROBIAL YEAST SPORIDILOBOLUS PARAROSEUS USING COPRODUCTS

**Abstract:** Its main industrial sources of obtaining chemical synthesis Carotenoids are a group of natural pigments widely distributed in nature, in plants, flowers and micro-organisms, the main sources of industrial obtaining chemical synthesis, extraction plants and biotechnological production, which is attracting growing interest. Through a central composite rotatable design was  $2^2$  possible to study the effects of the composition of the culture medium with raw glycerol (5 to 10  $\text{g.L}^{-1}$ ) and corn steep liquor (20 to 30  $\text{g.L}^{-1}$ ) at 25°C, 180 rpm for 168 h. The use of 9 to 10  $\text{g.L}^{-1}$  of raw glycerol and 26 to 30  $\text{g.L}^{-1}$  corn steep liquor reached the maximum yield in carotenoids of 640  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (126.83  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) in 168 h, a cell concentration of 6.8  $\text{g.L}^{-1}$ , productivities in carotenoids and biomass of 4.78  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (0.55  $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) and 0.04  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectively. Therefore, a gain of approximately 49% and 56% in volumetric and specific production of carotenoids, respectively, compared with the lowest result of each response. Thereby demonstrating the potential of *Sporidiobolus pararoseus* as a source of microbial carotenoids using agroindustrial byproducts.

**Keywords:** carotenoids, co-products, yeast.

### 1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são hidrocarbonetos lipossolúveis encontrados abundantemente na natureza com mais de 600 estruturas caracterizadas, apresentando variação de cor do amarelo até o vermelho, presentes em frutas, vegetais, flores e micro-organismos. Estes pigmentos tem

desempenhado papel importante na saúde humana, como precursores de vitamina A, antioxidante e estimula a produção de anticorpos (CABRAL et al., 2011; AMAR et al., 2012).

Os carotenoides têm ganhado destaque na indústria de farmaco e alimentícia, pois são corantes naturais utilizados em cosméticos, alimentos e rações animais. Suas propriedades fisiológicas são inúmeras, por esse motivo ele vem ganhando grande aprovação dos consumidores. Entretanto o mercado global apresenta uma perspectiva de demanda para o ano de 2017 de 10 bilhões de toneladas, com taxa de crescimento de 2,9%/ano (VENIL et al., 2013). Atualmente boa parte do mercado é derivada da síntese química, não satisfazendo o desejo do consumidor por busca de corantes naturais.

Assim, os aspectos negativos do uso de carotenoides obtidos pela síntese química vêm aumentando o interesse na obtenção de carotenoides por processos biotecnológicos utilizando diferentes leveduras (MACHADO, 2013; MICHELON et al., 2012; SILVA et al., 2012; CIPOLATTI, 2012; FONSECA et al., 2011; OTERO, 2011; SILVA, 2010; SILVA, 2009) e microalgas (REIS, 2012).

Existem alguns micro-organismos produtores de carotenoides como a *Phaffia rhodozyma* (RAMÍREZ, 2000; FRENGOVA e BESHKOVA, 2009) e *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU e EREN, 2005). Dentre as leveduras carotenogênicas destacam-se a, *Sporidiobolus pararoseus*

Porém, a obtenção microbiana de carotenoides é limitada principalmente pelo custo elevado de produção. Entretanto, este custo pode ser minimizado aperfeiçoando/otimizando seu processo e aproveitando coprodutos industriais de menor custo como fontes nutrientes alternativas (MALDONADE et al., 2007).

Os coprodutos agroindustriais como farelo de soja, caldo de cana, ureia, mosto de uva, soro de leite, água de maceração de milho, melaço de cana, melaço de beterraba, glicerol bruto e água de parbolização de arroz podem ser utilizados como substratos no meio de cultivo, por diferentes micro-organismos para produção de pigmentos, como fontes de carbono e nitrogênio alternativas. O objetivo desse trabalho foi produzir, através de cultivos submersos, biomassa rica em carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* aproveitando glicerol bruto e água de maceração de milho, provenientes respectivamente do processo biodiesel, e da moagem do milho úmido.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismo

Foi utilizado a levedura *Sporidiobolus pararoseus* previamente isolada e identificada por Otero (2011). A linhagem foi mantida em ágar GYMP (2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 1 g.L<sup>-1</sup> extrato de malte, 0,5 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,2 g.L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,8 g.L<sup>-1</sup> ágar) estocada em refrigeração e reativa em ágar YM (3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> e extrato de malte, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 0,2 g.L<sup>-1</sup> de ágar) (Coelho, 2005) 72 h a 25°C.

### 2.2. Substratos agroindustriais

Os substratos agroindustriais utilizados foram o glicerol bruto (BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A - Passo Fundo – RS) oriundo da produção de biodiesel, o melaço de cana-de açúcar (Guimarães Indústria e Comércio Ltda. - RS), ambos como fonte de carbono, e a água de maceração de milho (Corn Products de Balsa Nova - PR) da moagem do milho úmido, usada como fonte de nitrogênio, previamente caracterizados Otero (2011), Silva et al. (2012) e Cipolatti, (2012).

### 2.3. Preparo do inóculo

A partir dos tubos contendo os micro-organismos em ágar YM inclinado, foi realizada uma suspensão celular em 1 mL de água peptonada estéril (0,1%) e adicionada em 9 mL de caldo YM, sendo incubados a 25°C por 48 h. O inóculo foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL do meio YM, previamente esterilizado a 121°C por 15 min, acrescidos da suspensão celular, sendo incubados a 25°C, 150 rpm por 48 h ou tempo necessário para atingir  $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, contadas através de câmara de Neubauer (Silva, 2010).

### 2.4. Cultivo

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 500 mL com 225 mL de meios, o pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo, iniciando o cultivo com  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, sendo as condições operacionais do processo 25°C, 180 rpm por 168h (Silva, 2009). Nas primeiras 48 h de cultivo as amostras foram retiradas em intervalados de 12 h, onde posteriormente foi retirando em intervalos regulares a cada 24 h até o término do processo (168 h), para acompanhar biomassa, pH, açúcares e carotenoides totais.

### 2.5. Otimização dos meios agroindustriais

Os efeitos da composição do meio agroindustrial sem pré-tratamento foi estudado a partir do delineamento central composto rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, apresentado na tabela 1, tendo como respostas carotenoides totais (µg.L<sup>-1</sup>) e carotenoides específicos (µg.g<sup>-1</sup>), produtividades, biomassa e relação C/N. Para cada ensaio foi determinado a razão carbono (C) e nitrogênio (N), identificando a razão C/N ótima para a melhor produção.

### 2.6. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um potenciômetro, segundo AOAC (2000).

### 2.7. Determinação da concentração de biomassa

A concentração celular ao longo da bioprodução dos carotenoides foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, através de uma curva padrão de biomassa (Kusdiyantini et al. 1998).

### 2.8. Recuperação de carotenoides totais

A recuperação de carotenoides totais foi realizada conforme metodologias descritas anteriormente Fonseca et al. (2011), Michelon et al. (2012) adaptada por Ciolatti (2012). A biomassa foi centrifugada a 3439 xg por 10 min, transferidas para placa de Petri e colocada em estufa de circulação de ar (30°C por 48 h) Fonseca et al. (2011), posteriormente macerada em um grau, padronizada em peneira com mesh 115 e congeladas a -18°C por 48 h (CIOLATTI et al., 2012). Posterior à etapa de congelamento, a biomassa foi submetida a uma lise com o agente de ruptura dimetilsulfóxido - DMSO ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO), seguido por agitação em vórtex durante 1 minuto, em intervalos de 15 min, totalizando 1 h (FONSECA et al., 2011). Após a ruptura foi adicionada acetona, seguido de centrifugação (3439 xg por 10 min). O sobrenadante foi separado e foram realizadas sucessivas extrações até o branqueamento

total da célula. Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, foram adicionados de solução de NaCl 20% (p/v) e éter de petróleo. Após a formação de duas fases foi coletado a fase polar e o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), originando os extratos carotenogênicos (MICHELON et al., 2012).

### 2.8.1. Determinação de carotenoides totais

A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China) através do valor médio da máxima absorbância a 448 nm (CABRAL et al. 2011), expresso em termos de seu carotenoide majoritário ( $\beta$ -caroteno em éter de petróleo com absorvidade específica de  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$ ), utilizando a equação 1 Davies (1976).

$$CT = \frac{A * V * 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * 100 * m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

Onde CT é concentração específica de carotenoides de totais ( $\mu\text{g/g}$ ), A é absorvância, V é volume (mL),  $m_{\text{amostra}}$  e massa celular seca (g) e  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  é absorvidade específica. Para o cálculo da produção volumétrica de carotenoides totais ( $\mu\text{g/L}$ ) foi realizada uma conversão de unidades utilizando o resultado de concentração de carotenoides totais ( $\mu\text{g/g}$ ) e da concentração da biomassa (g/L).

### 2.9. Determinação da concentração de açúcares totais

A concentração açúcares não redutores foi determinada através do método DNS (Miller, 1959).

### 2.10. Análise estatística

Para avaliação do desempenho substratos agroindustriais, as análises foram conduzidas em triplicata no ponto central, sendo os resultados analisados estatisticamente utilizando o software Statística 7.0 (Startsoft).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As respostas avaliadas foram os máximos valores alcançados na produção volumétrica de carotenoides ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) em cada ensaio, e neste mesmo tempo os respectivos valores alcançados na produção específica de carotenoides ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), a biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ), a produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e a relação C/N de cada meio.

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis em estudo, bem como suas respostas. Enquanto a Figura 1 mostra o acompanhamento desta bioprodução de carotenoides, envolvendo a produção de carotenoide volumétrico (a), carotenoide específico (b), produção celular (c), pH (d) e açúcar redutor total (e) para os ensaios do planejamento fatorial.

Analisando a Tabela 1 é possível verificar uma variação nas repostas, como a máxima produção volumétrica de carotenoides de  $154,86 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ensaio 1) a  $640 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ensaio 4), máxima produção específica de  $35 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ensaio 1) a  $99,06 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ensaio 4), concentração de

biomassa de 4,42 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 1) a 6,47 g L<sup>-1</sup> (ensaio 4) e a razão C/N dos meios de produção que apresentaram pequenas modificações de 6,55 (ensaio 3) a 9,82 (ensaio 2). A produtividade em carotenoides volumétricos variou de 0,922 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaio 1) a 3,813 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaio 4), a produtividade em carotenoides específicos de 0,208 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaio 1) a 0,59 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaio 4) e a produtividade em biomassa variando entre 0,026 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaio 1) a 0,039 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaio 4). Em geral observa-se também que os máximos valores de carotenoides volumétricos, específicos e biomassa encontrados estão nos maiores níveis das concentrações do glicerol e AMM, demonstra uma provável necessidade de ampliação da faixa de concentração para este substrato.

Nota-se na Tabela 1 que a condição do ensaio 4, formulada com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e com 30 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho, apresentou uma relação C/N de 8,26, e resultou nas maiores respostas para bioprodução de carotenoides 640 µg.L<sup>-1</sup> (99,06 µg.g<sup>-1</sup>), em 168h de cultivo, a partir de 4,42 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, apresentando produtividades em carotenoides de 3,816 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0,208 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e produtividade em biomassa 0,039 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

O perfil de pH dos cultivos (Figura 1b) de todos os ensaios para *S. pararoseus* apresentou um comportamento crescente ao longo das 168 h de processo, já observado anteriormente por Otero (2011) e Cipolatti (2012), para este mesmo micro-organismo em diferentes composições de meios formulados com estes coprodutos agroindustriais.

Tabela 1 – DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para os meios agroindustriais com glicerol bruto e AMMM.

Ensaios	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>7</sub>
1	5 (-1)	20 (-1)	154,86 (168h)	35,00	4,42	7,42	0,922	0,208	0,208
2	10 (+1)	20 (-1)	283,19 (144h)	46,78	6,05	9,82	1,967	0,325	0,325
3	5 (-1)	30 (+1)	163,03 (168h)	35,84	4,55	6,55	0,970	0,213	0,213
4	10 (+1)	30 (+1)	640,54 (168h)	99,06	6,47	8,26	3,813	0,590	0,590
5	7,5 (0)	25 (0)	348,95 (168h)	59,82	5,83	7,93	2,078	0,356	0,356
6	7,5 (0)	25 (0)	349,63 (168h)	58,53	5,97	7,93	2,081	0,348	0,348
7	7,5 (0)	25 (0)	345,83 (168h)	57,70	5,99	7,93	2,059	0,343	0,343
8	5 (-1)	20 (-1)	154,86 (168h)	35,00	4,42	7,42	0,922	0,026	0,026
9	10 (+1)	20 (-1)	283,19 (144h)	46,78	6,05	9,82	1,967	0,042	0,042
10	5 (-1)	30 (+1)	163,03 (168h)	35,84	4,55	6,55	0,970	0,027	0,027

X<sub>1</sub>=Melaço (g.L<sup>-1</sup>); X<sub>2</sub>=Água de maceração de milho (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>1</sub>=Produção volumétrica (µg.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>=Produção específica (µg.g<sup>-1</sup>); Y<sub>3</sub>=Biomassa (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>4</sub>=C/N (relação Carbono e nitrogênio no meio de cultivo); Y<sub>5</sub>=Produtividade em Carotenoides volumétricos. (µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e Y<sub>6</sub>= Produtividade em carotenoides específicos (µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), Y<sub>7</sub>= Produtividade em Biomassa (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Na literatura, alguns trabalhos relatam a utilização de diferentes substratos e condições de processos para bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*. Maldonado et al. (2008), isolou e identificou a levedura *Sporobolomyces roseus* na qual realizou o cultivo em meio complexo comercial (YM) onde a produção alcançou 237 µg.L<sup>-1</sup> em carotenoides com 3,3 g.L<sup>-1</sup> de biomassa. A utilização de meios complexos (fontes alternativas de nutrientes) podem apresenta uma produção equivalente ou superior aos meios complexos comerciais.

As leveduras pigmentadas podem ser provenientes de várias fontes ambientais que podem ser cultivadas e purificadas. Vários meios de crescimento podem ser usados para isolar os diferentes tipos de leveduras produtoras de pigmentos. No entanto, devido ao elevado custo da utilização de meio sintético, há uma necessidade de desenvolver um novo processo de baixo custo para a produção de pigmentos. A utilização de fontes alternativas de nutrientes fornecem um meio rentável para reduzir custo de substratos. Nos achados de Manowattana et

al. (2012) compararam a produção de biopigmentos utilizando meio comercial suplementado com coproduto frente a um meio sintético, na qual a produção alcançada em carotenoides pela levedura *S. pararoseus* (TISTR5213) foi de 16,55 mg.L<sup>-1</sup> com 8,64 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, com 34 g.L<sup>-1</sup> de glicerol suplementado em meio BMP e para o meio comercial (YM) uma produção de 4,87 mg.L<sup>-1</sup> com 6,68 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, sendo as condições a 24°C, 200 rpm, 24°C por 120 h e pH inicial de 6,0. O custo da produção para o meio composto com glicerol foi de 1,09 Baht.mg<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> em contra partida ao meio sintético de 12,08 Baht.mg<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> (baht é a moeda da Tailândia).

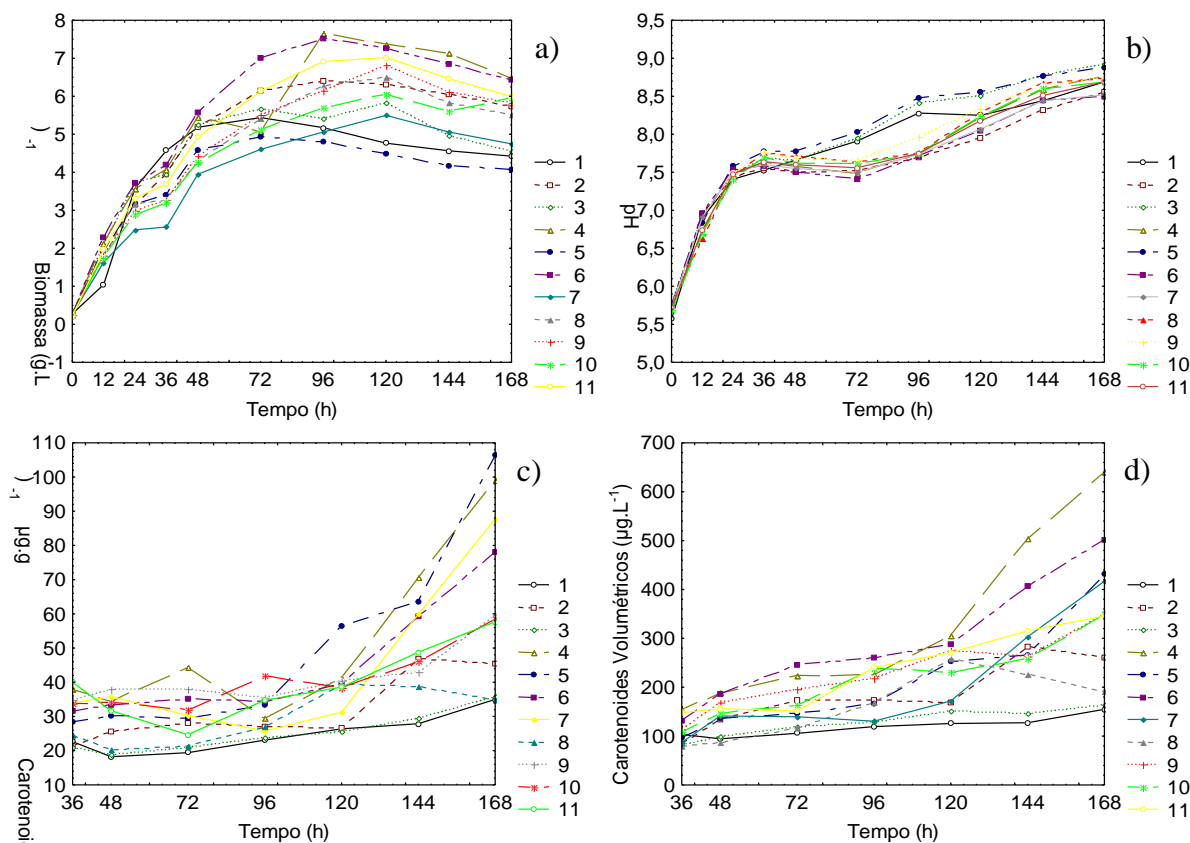


Figura 1 – Cinética da evolução do crescimento celular (a), pH (b), produção específica (c), produção volumétrica (d) por *S. pararoseus* ao longo de 168 h, a 25 °C e 180 rpm, no delineamento central composto rotacional 2<sup>2</sup> com meios de cultivo contendo glicerol bruto e água de maceração de milho.

Para a construção dos modelos empíricos foram calculados os coeficientes de regressão e realizada ANOVA (Tabela 2). Com a razão Fcalculado/Ftabelado superior a 3 (Rodrigues e Iemma, 2011) foi possível obter modelos preditivos e significativos para todas as respostas em função das variáveis melaço e água de maceração de milho (equações 02 a 07), possibilitando a construção das superfícies de contorno mostradas na Figura 2.

$$\text{Carotenóides volumétricos } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 326,57 + 151,46.\text{GLI} + 91,38*\text{AMM} + 87,30. \text{GLI}.\text{AMM} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoide Especifico } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 56,10 + 18,75.\text{GLI} + 13,28.\text{AMM} + 12,86.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (3)$$

$$\text{Biomassa } (\text{g.L}^{-1}) = 5,61 + 0,89.\text{GLI} \quad (4)$$

$$\text{C/N} = 7,98 + 1,03.\text{GLI} - 0,61.\text{AMM} - 0,017.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (5)$$

$$\text{Prod. Vol. } (\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 1,98 + 0,972.\text{GLI} + 0,474.\text{AMM} + 0,450.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (6)$$



$$\text{Prod. Esp. } (\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 0,340 + 0,124.\text{GLI} + 0,068 \text{ AMM} + 0,065.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (7)$$

$$\text{Prod. Bio. } (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 0,034 + 0,007\text{GLI} \quad (8)$$

Onde: GLI: glicerol bruto, AMM: água maceração de milho.

Tabela 2 – Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	PVC	PEC	PVC	PEC	PVC	PEC	PVC	PEC
Regressão	155643,4	2773,21	3	3	51881,13	924,40	63,56	74,55
Resíduo	2448,8	37,20	3	3	816,27	12,4		
Total	158092,2	2810,41	6	6				

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Bio.	CN.	Bio.	C/N	Bio.	C/N	Bio.	C/N
Regressão	3,16	5,813	1	3	3,16	1,94	24,31	340,35
Resíduo	0,64	0,017	5	3	0,13	0,0057		
Total	3,80	5,83	6	6				

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Prod. Vol.	Prod. Esp.	Prod. Vol.	Prod. Esp.	Prod. Vol.	Prod. Esp.	Prod. Vol.	Prod. Esp.
Regressão	5,489	0,096134	3	3	1,83	0,032	130,71	200
Resíduo	0,041	0,000472	3	3	0,014	1,57.10 <sup>-4</sup>		
Total	5,53	0,096606	6	6				

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.
Regressão	0,000196		4		0,000049		16,67	
Resíduo	0,000014		5		0,000003			
Total	0,000210		6					

PVC = Produção volumétrica de carotenoides; PEC = produção específica de carotenoides; Bio = Biomassa; C/N = Relação carbono e nitrogênio; Prod. Vol. = Produtividade em carotenoides volumétricos; Prod. Esp. = Produtividade em carotenoides específicos e Prod. Bio. = Produtividade em biomassa. PVC (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28); PEC (R: 0,99, F<sub>3; 7; 0,95</sub> = 9,28), Bio (R: 0,91, F<sub>1; 5; 0,95</sub> = 6,61), C/N. (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28), Prod.Vol (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28), Prod. Esp. (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28) e Prod. Bio. (R: 0,93, F<sub>4; 5; 0,95</sub> = 5,19).

Com as curvas de contorno expostas nas Figuras 2a e 2b verifica-se que para obter elevada produção volumétrica e específica de carotenoides é possível trabalhar na faixa 9 a 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol combinado com 26 a 30 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho. Na utilização de 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto associado a qualquer variação de 20 a 30 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho, é possível obter maiores concentrações de biomassa (Figura 2c).

Para aumentar a relação carbono e nitrogênio do meio de cultivo deve-se trabalhar com glicerol na faixa de 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> e baixa concentração de água de maceração de milho 20 a 22 g.L<sup>-1</sup> (Figura 2d). No entanto, vale ressaltar que as maiores produções de carotenoides e produtividades do processo de obtenção de carotenoides não foram observadas

nestas maiores relações C/N (aproximadamente 10) e sim em relações C/N intermediárias (6 aproximadamente) onde as maiores produção de carotenoides foram de  $640,54 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $99,06 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) tendo as produtividades de  $3,813 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ( $0,59 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

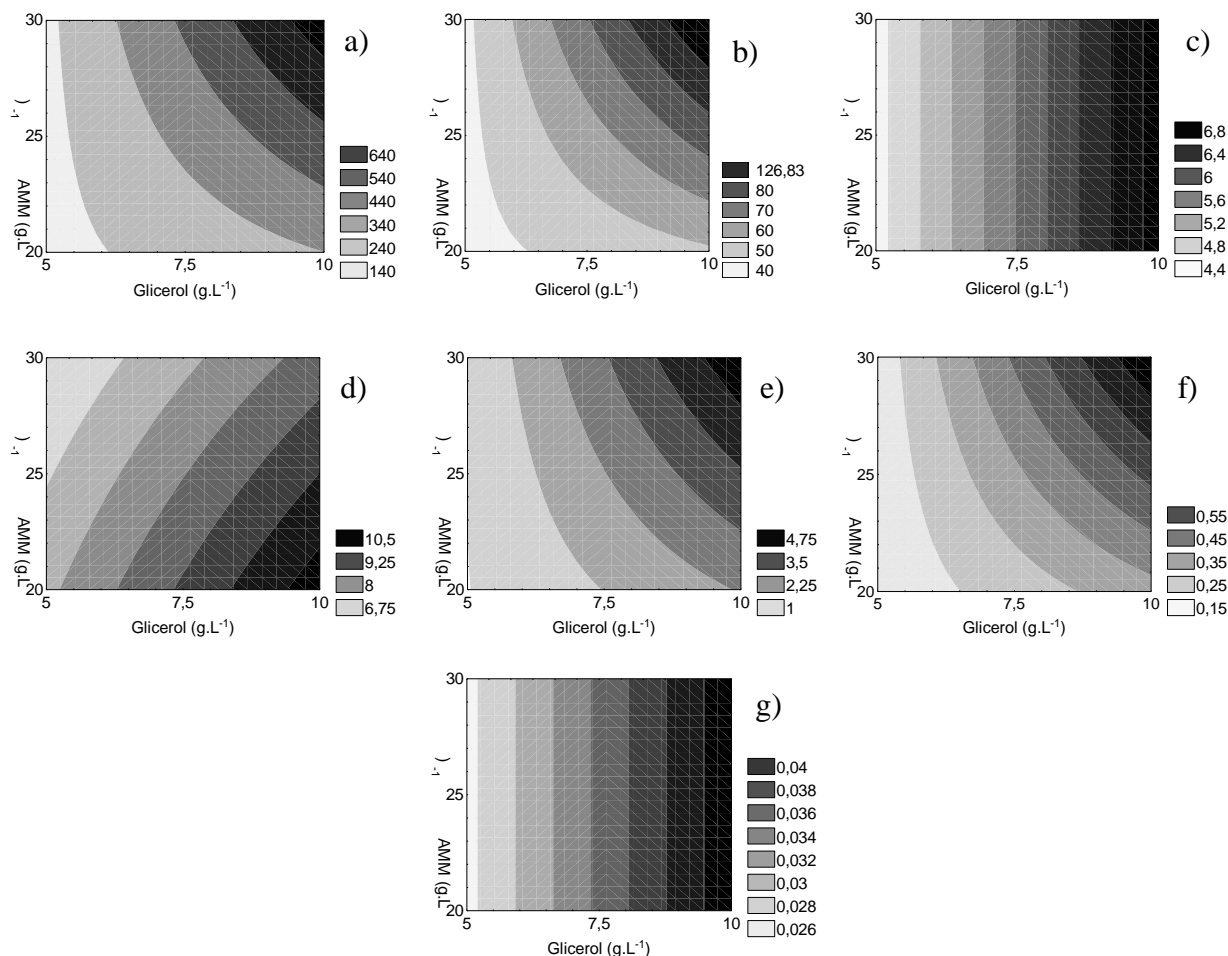


Figura 2 – Curva de contorno para as respostas produção volumétrica (a), produção específica (b), biomassa (c) relação C/N (d), produtividade em carotenoides volumétricos (e), produtividade em carotenoides específicos (f) e produtividade em biomassa (g). AMM = água de maceração de milho.

Quando utilizado água de maceração de milho na faixa 28 a 30 g.L<sup>-1</sup> juntamente com glicerol bruto entre 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> é possível obter as maiores produtividades volumétricas (Figura 2e) e específicas de carotenoides (Figura 2f). Para ter elevada produtividade em biomassa deve-se trabalhar com glicerol na faixa de 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> e água de maceração de milho entre 20 a 30 g.L<sup>-1</sup> (Figura 2g).

Na Figura 2 analisando todas as superfícies de contorno percebe-se que o aumento da concentração dos substratos pode favorecer um incremento na produção e produtividade em carotenoides. Portanto, um novo sequenciamento do planejamento experimental será realizado aumentando a concentração da AMM e glicerol bruto.

#### 4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil.



## 5. CONCLUSÃO

A utilização de 9 a 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol na combinação com 26 a 30 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho foi obtido uma na produção de carotenoides de 76% (640 µg.L<sup>-1</sup>), se comparado com o menor resultado experimental, além da concentração celular de 6,8 g.L<sup>-1</sup>, uma produtividade em carotenoides de 4,78 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0,55 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e produtividade em biomassa 0,04 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Dessa forma demonstrando o potencial da *Sporidiobolus pararoseus* como fonte de carotenoides microbianos utilizando coprodutos agroindustriais.

## 6. REFERÊNCIAS

**AMAR, E. C.; KIRON, V; AKUTSU, T.; SATOH, S.; WATANABE, T.** *Resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) experimental infection following ingestion of natural and synthetic carotenoids.* *Aquaculture*, v. 330, n.1, p. 148-155, 2012

Association of Official Analytical Chemists – AOAC.; **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**, 16th ed., AOAC International: Washington, 1995.

**AKSU<sup>1</sup>, Z.; EREN, A. T.** *Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source.* *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 2985-2991, 2005.

**CABRAL, M. M. S.; CENCE, K.; ZENI, J.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H.** *Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation.* *European Food Research and Technology*, v. 233, n. 1, p. 159-166, 2011.

**Cipolatti E. P.** 2012. Carotenoides microbianos: Avaliação da atividade antioxidante e aproveitamento de coprodutos agroindustriais. Rio Grande – RS, 120pag. *Dissertação* (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

**Coelho A. R.** 2005. Controle de *penicillium expansum*/biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita. Londrina – PR, 122pag. *Tese* (Pós-Graduação em Ciências de Alimento). Universidade Estadual de Londrina (UEL).

**FONSECA R. A. S., RAFAEL R. S., KALIL S. J., BURKERT A. V., BURKERT J. F. M.** *Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*.* *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

**FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M.** *Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance.* *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, p. 163-180, 2009.

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

**Machado, W. R. C. 2013.** Otimização da produção de carotenoides por *Sporodiobolus pararoseus* e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais. Rio Grande – RS, 103pag. *Dissertação* (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

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

**MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.** *Selection and characterization of carotenoids- producing yeasts from Campinas region, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n.1, p. 65-70, 2007.

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

**OTERO D. M.** 2011. Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides. Rio Grande – RS, 114pag. *Dissertação* (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

**REIS, D. F.** Crescimento celular e produção de carotenoides pela microalga *Haematococcus pluvialis*. Rio Grande – RS, 2012, 81p. *Dissertação* (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

**SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M.** *Carotenoid Production by Phaffia rhodozyma Using Raw Glycerol as an Additional Carbon Source. International Journal of Food Engineering*, v. 8, n. 4, p. 1556-3758, 2012.

**Silva M. C.** 2004. Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos. Campinas – SP, 112pag. *Tese* (Doutorado em Ciência de Alimento), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

**Silva D. A.** 2009. Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz. Rio Grande, RS, 92 pag. *Dissertação* (Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

**Silva C. M.** 2010. Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL-Y 17268: valoração da glicerina (derivada da síntese do biodiesel) e da água de parboilização do arroz. Rio Grande – RS, 105pag. *Dissertação* (Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

**RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.** *Planejamento de Experimentos e Otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*, ed. Casa do Pão: Campinas, 2011.

**MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P.** *Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. Food Chemistry*, v. 107, n. 1, 145-150, 2007.

**Mendes, G. L.** 2006. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré tratados. Campinas – SP, 89pag. *Dissertação* (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

**RAMÍREZ, J.; NUÑEZ, M. L.; VALDIVIA, R.** *Increased astaxanthin production by a Phaffia rhodozyma mutant grown on date juice from Yucca fillifera. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 24, p. 187-190, 2000.

**VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A.** *Bacterial pigments and their application.s Process Biochemistry*, v. 48, n. 1, p. 1065-1079, 2013.