

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES MICROBIANOS

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

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

Resumo: Os carotenoides são hidrocarbonetos abundantemente encontrados na natureza, apresentando propriedades funcionais e sendo responsáveis pela coloração em plantas e micro-organismos. Dentre as leveduras produtora de carotenoides, uma que se destaca é a *Sporidiobolus pararoseus*, pela sua fácil adaptação a meios complexos utilizando fontes alternativas de nutrientes. Os carotenoides são biomoléculas reativas que apresentam capacidade de atuar nos radicais livres, entretanto, quando expostos a altas temperaturas pode provocar sua degradação. Este trabalho teve como objetivo testar a influência da variação de temperatura (25 a 55°C) na extração de biopigmentos bem como testar a influência da liofilização (-80°C por 48 h) e a secagem convencional por estufa de circulação de ar forçado (25°C por 48 h), além de verificar a produção de carotenoides em meio alternativos de nutrientes. O aumento da temperatura de extração influenciou significativamente ($p < 0,05$) diminuindo a recuperação dos carotenoides, sendo que a 25 °C a recuperação foi 77% superior em relação a 55°C. O processo de secagem de biomassa através do processo de liofilização proporcionou uma maior recuperação de carotenoides 870,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (105,24 $\mu\text{g.g}^{-1}$) que a secagem por circulação de ar 486,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (58,79 $\mu\text{g.g}^{-1}$), com um ganho de aproximadamente 44% no teor de carotenoides recuperados.

Palavras-chave: processo de secagem; resíduos agroindustriais; fermentação.

INFLUENCE OF TEMPERATURE IN THE EXTRACTION OF CAROTENOIDS

Abstract: The carotenoids are hydrocarbon found abundantly in nature, having functional properties and are responsible for color in plants and microorganisms. Among the carotenoid-producing yeast, one that stands out is the *Sporidiobolus pararoseus*, for its easy adaptation to complex media using alternative sources of nutrients. Carotenoids are reactive biomolecules having capacity to act on free radicals, however, when exposed to high temperatures can cause degradation. This study aimed to test the influence of temperature variation (25 to 55°C) in the extraction biopigments well as test the influence of lyophilization (-80°C for 48 h) and conventional drying oven with air circulation forced (25°C for 48 h) and to verify the production of carotenoids in alternative nutrient medium. The extraction temperature increased significantly ($p < 0.05$) decreased recovery of carotenoids, whereas at 25°C the recovery was 77% higher than 55°C. The drying process of biomass by freeze drying gave a higher recovery of carotenoids $\mu\text{g.L}^{-1}$ 870.04 (105.24 $\mu\text{g.g}^{-1}$) that the drying air circulation 486.06 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (58.79 $\mu\text{g.g}^{-1}$), with a gain of about 44% in the content of carotenoids recovered

Keywords: drying process; agroindustrial residues; fermentation.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são hidrocarbonetos lipossolúveis produzidos naturalmente por plantas e diversos organismos incluindo, fungos, bactérias e leveduras (HUANG et al., 2013). Estes compostos são antioxidantes conhecidos que têm potencial impacto positivo na saúde humana. Suas propriedades fisiológicas são inúmeras, por esse motivo ele vem ganhando grande aprovação dos consumidores. Os pigmentos carotenogênicos são utilizados como corantes naturais em cosméticos, alimentos e rações animais (CABRAL et al., 2011; AMAR et al., 2012).

Estima-se que a demanda para o mercado global para o ano de 2017 será de 10 bilhões de toneladas, com taxa de crescimento anual de 2,9%/ano (VENIL et al., 2013). Atualmente, o mercado é suprido pela produção de carotenoides quimicamente sintetizados através de síntese química ou por extrações de vários solventes a partir de fontes não microbianas. Não

satisfazendo o desejo do consumidor por produtos com menos tóxicos, com mais material de partida natural favorecendo as linhas de produção atuais (ABEROUMAND, 2011).

Por outro lado à extração de carotenoides microbianos não dependem de fatores como sazonalidade climática, disponibilidade de matéria prima, se comparado aos métodos de extração em plantas a qual estes apresentam menor variabilidade em sua composição química (VALDUGA et al., 2013). Com os avanços na engenharia de bioprocessos e engenharia genética têm potencializado as rotas de biossíntese de carotenoides como introdução de genes de outra levedura para melhorar o fluxo metabólico e/ou seleção de mutantes altamente produtores (FARHI, et al., 2011; PERALTA-YAHYA et al., 2011; ZHAO et al., 2013).

As leveduras por sua vez se destacam entre os micro-organismos produtores, devido sua alta taxa de crescimento, menor utilização do espaço para a produção e capacidade de cultivo em meios alternativos, como coprodutos agroindustriais (Silva, 2004; Valduga et al., 2011). Os corantes obtidos por via microbiana tem sido uma alternativa e vem despertando crescente interesse, aliado a utilização de coprodutos como meio de cultivo para minimizar o custo de produção e também possibilitar uma diminuição nos volumes dos rejeitos agroindustriais (MALDONADE et al., 2007; TASKIN et al., 2011).

Uma outra opção não muito explorada são as diversas técnicas de secagem para biomassa obtido do cultivo em meio líquido, um passo indispensável da produção de carotenoides microbianos. Outro obstáculo relacionado os carotenoides são biomoléculas reativas que apresentam dificuldades para seu armazenamento, pois oxidam na presença de calor, luz e oxigênio (ZEB; MURKOVIC, 2011). Entretanto existem diversos tipos de secagem como leito fixo ou secagem por estufa, na qual este provoca uma desidratação na amostra e podem interferir diretamente no grau dos constituintes do produto, podendo remover mais água ou acarretar maior dano nas propriedades nos alimentos (SANTOS et al., 2012).

O método convencional de secagem através de estufa com circulação consiste na aplicação do calor produzido artificialmente em condições de temperatura e umidade e corrente de ar controlado. É uma técnica de custo relativamente baixo, porém, pode provocar alguns danos como perda de vitaminas, antioxidantes e outros componentes. (BARNWAL; TIWARI, 2008). Enquanto que a liofilização é um processo de desidratação de produtos em condições de pressão e temperatura, tais que a água previamente congelada, passa do estado sólido para o estado gasoso por sublimação, com esse é realizado a baixa temperatura e ausência do ar atmosférico permite que as propriedades químicas e organolépticas praticamente não se alterem (KASPER et al., 2013).

Diante do exposto e por poucos trabalhos referentes à secagem de biomassa microbiana, o presente trabalho teve por objetivo testar as diferentes temperaturas para extração de carotenoides, bem como os tipos de secagem por estufa e liofilização, verificando as possíveis perdas de carotenoides decorrentes desse processo de secagem. Além da produção de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* em fontes alternativas de nutrientes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A levedura *Sporidiobolus pararoseus* previamente isolada e identificada por Otero (2011). A linhagem foi mantida em ágar GYMP (2 g.L⁻¹ glicose, 1 g.L⁻¹ extrato de malte, 0,5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 0,2 g.L⁻¹ NaH₂PO₄ e 1,8 g.L⁻¹ ágar) estocada em refrigeração. Antes dos

ensaios a levedura era reativa em ágar YM (3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ e extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose, 0,2 g.L⁻¹ de ágar) (Coelho et al., 2007) 72 h a 25°C.

2.2. Substratos industriais

O glicerol bruto (BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A - Passo Fundo – RS) da produção de biodiesel e o melaço de cana-de açúcar (Guimarães Indústria e Comércio Ltda. - RS) da produção de açúcar, ambos como fonte de carbono. A água de maceração de milho (Corn Products de Balsa Nova - PR) da moagem do milho úmido como fonte de nitrogênio.

2.4. Preparo do inoculo

A partir dos tubos contendo a *S. pararoseus* em ágar YM inclinado, foi realizada uma suspensão celular 1 mL em água peptonada estéril (0,1%) e adicionada em 9 mL de caldo YM modificado, sendo incubados a 25°C por 48 h. O inoculo foi cultivado 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 1x10⁸ células.mL⁻¹, enumeradas em câmara de Neubauer (MICHELON et al., 2012).

2.5. Cultivos em frascos agitados

Os cultivos para bioprodução de carotenoides foram realizados em erlenmeyers de 500 mL com 250 mL do meio de cultivo, pH inicial de 6,0, acrescidos de 10 % de inoculo (iniciando o cultivo com 1x10⁷ células.mL⁻¹), sendo as condições operacionais do processo 25 °C, 180 rpm (agitador orbital Tecnal modelo TE 424), sem iluminação por 168h (FONSECA et al., 2011; MICHELON et al., 2012). As amostras foram retiradas a cada 24 h, para acompanhar biomassa, pH, açúcares e carotenoides totais.

2.6. Determinação da concentração de biomassa

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

2.7. Determinação do pH

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

2.8. Determinação da concentração de açúcares redutores totais

As amostras dos meios com os coprodutos foram hidrolisadas com HCl 2 M em banho a 55°C por 30 min, seguido de adição de NaOH 2 M. A determinação de açúcares redutores totais (ART) foi realizada empregando o método espectrofotométrico do 3-5 ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de glicose, cuja concentração variou entre 0,1 e 1 g.L⁻¹.

2.9. 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 Cicolatti (2012). A biomassa foi centrifugada a 3439 xg por 10 min, transferida 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 (CIPOLATTI et al., 2012). Posterior à etapa de congelamento, a biomassa foi submetida a uma lise com o agente de ruptura dimetilsulfóxido - DMSO ((CH₃)₂SO), 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.

2.9.1. Formação do extrato e determinação dos carotenoides totais

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 (Na₂SO₄), originando os extratos carotenogênicos (MICHELON et al., 2012).

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

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

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

2.11. Técnicas de rompimento celular

Para a extração de carotenoides produzidos pela levedura *S. pararoseus* foram utilizado diferentes temperaturas de extração. Além disso, foram testados dois tipos de secagem, em estufa (25°C por 48 h) e por liofilização (-80°C por 48 h), nesse ultimo condição foram testado métodos mecânicos de rompimento.

2.11.1. Extração em diferentes temperaturas

Em tubos contendo 0,05 de biomassa seca (25°C por 48 h) foram adicionado o agente de ruptura, dimetilsulfóxido - DMSO ((CH₃)₂SO), o mesmo foram levados em banho Maria na faixa de temperatura determinada variando de 20 a 55°C. Os tubos foram homogeneizadas em vórtex, sendo que a cada intervalo de tempo, 15 min, era removido aquecimento térmico e homogeneizado em vórtex por 1 min ate completar um período de 1h de contato. 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. A determinação dos carotenoides seguiu-se o item 2.9.1.

2.11.2. Técnica com liofilização e peneira

O método de secagem da biomassa realizado em estufa por 48 h a 35°C (FONSECA et al., 2011) foi avaliada sendo a mesma substituída pelo processo de liofilização (-80°C por 48 h). Uma amostra de biomassa de 0,4 g obtida no final do processo (168 h) foi transferida para uma placa de Petri e armazenada por 24 h em ultra freezer (-80°C), sendo realizada a liofilização por 48 h (até restar 2% de umidade na amostra). Com a biomassa liofilizada foram testadas a presença e ausência de maceração na biomassa padronizada em mesh 115, na qual era depois transferido 0,05 g de biomassa em tubos de ensaio submetida a uma lise com o agente de ruptura, dimetilsulfóxido - DMSO ((CH₃)₂SO), seguido por agitação em vórtex durante 1 min, 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. A determinação dos carotenoides seguiu-se o item 2.9.1.

2.12. Análise estatística

Para avaliação do desempenho dos métodos de extração, as análises foram conduzidas em triplicata, sendo realizado teste de comparação de média (teste tukey).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da Figura 1 pode observar que a levedura apresentou crescimento logo após a inoculação, com fase exponencial até aproximadamente 24 h, sendo observado que a máxima produção de biomassa de 7,18 g.L⁻¹ em 120 h, no qual seu pH atingiu 8 onde indica um desaceleramento da multiplicação celular. O consumo de açúcares totais é bastante intenso nas primeiras horas, verificando-se que 70% daqueles inicialmente disponíveis foram consumidos nas primeiras 48 horas de cultivo. Além disso, verifica-se que a produção de carotenoides apresentou-se constante alcançando 507 µg.L⁻¹(108 µg.g⁻¹) em 168 h de cultivo. Resultado semelhante utilizando um planejamento do tipo Plackett-Burman, para produção de carotenoides microbiano da levedura *Sporidiobolus pararoseus*, em meio complexo, com 4 de pH, 10 g.L⁻¹ de extrato de malte, 10 g.L⁻¹ de peptona e 40 g.L⁻¹ de glicose, obtendo uma produção de 475,29 µg.L⁻¹ de carotenoides, na qual as condições operacionais foram a 25°C, 180 rpm, por 120h e com pH inicial 4 (CABRAL, 2011).

No screening realizado por Libkind e Broock (2006) dentre as 15 leveduras verificou para *Sporobolomyces patagonicus* uma produção de 580 µg.L⁻¹ (110 µg.g⁻¹) com 5.2 de biomassa em meio formulado 10 g.L⁻¹ de glicose, 2 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 2 g.L⁻¹, 2 g.L⁻¹ de KH₂(PO₄O), 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura, a 25°C, 25 rpm por 72 h, e pH inicial 5,0.

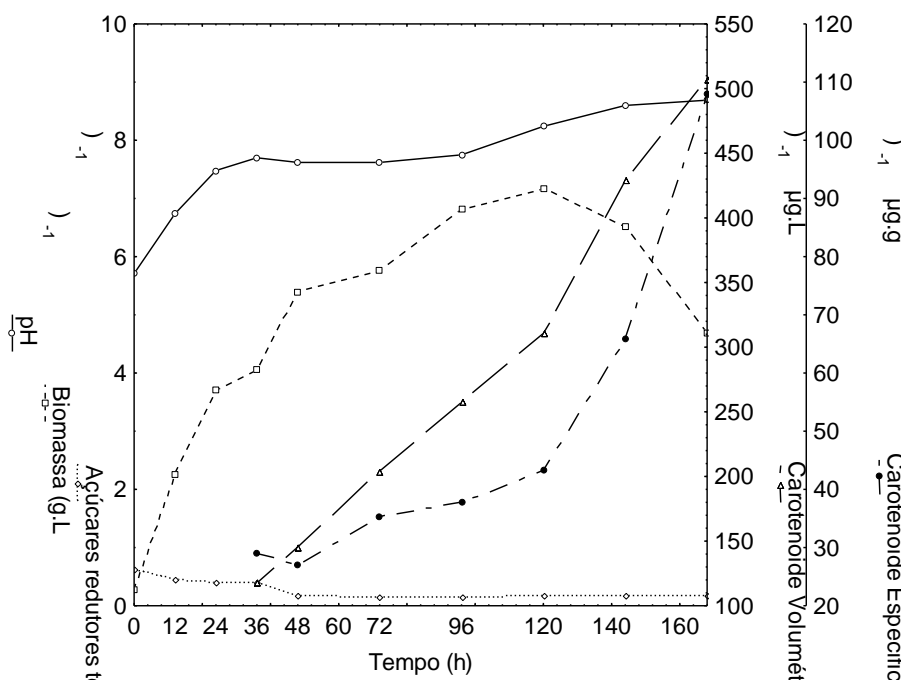


Figura 1 – Cinética da evolução do pH, biomassa, produção volumétrica e específica de carotenóides por *S. parvoseus* ao longo de 168 h, a 25°C e 180 rpm, com 7,5 de g.L⁻¹ de glicerol e 25 g.L⁻¹ de água de maceração de milho.

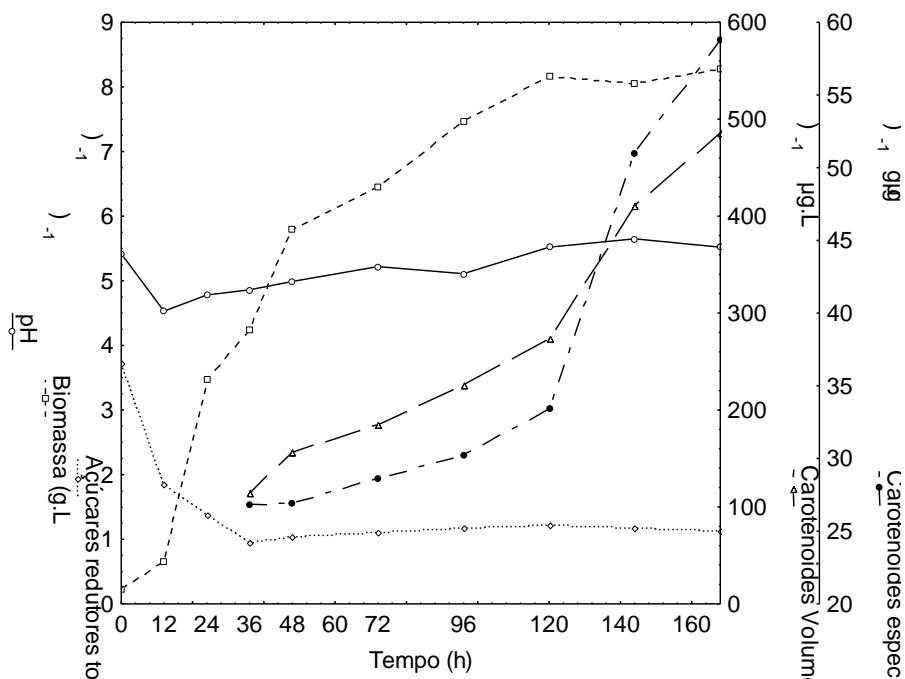


Figura 2 – Cinética da evolução do pH, biomassa, produção volumétrica e específica de carotenóides por *S. parvoseus* ao longo de 168 h, a 25°C e 180 rpm, com 30 de g.L⁻¹ de melão e 6,5 g.L⁻¹ de água de maceração de milho.

O segundo cultivo realizado consistiu em utilizar outra combinação de substratos agroindústrias o melão de cana de açúcar e água de maceração de milho para a produção de carotenóides por *S. parvoseus*. A Figura 2 apresenta os resultados médios da cinética dos cultivos para pH, concentração de biomassa, produção específica e volumétrica de carotenóides. O pH apresentou um decréscimo até 12 h de cultivo, com incremento até 72 h,

permanecendo praticamente constante até o fim do processo. Comportamento similar já observado anteriormente. A ligeira diminuição pode esta relacionada com a excreção de um carbono intermediário. Depois disso, o pH aumenta ate 72 h, mantendo-se praticamente constante ate o fim da produção de carotenoides, atingido valores entre 5,0-5,5.

Nos achados de Santo et al. (2012) e Frengova et al. (1994) descrevem que durante a biossíntese de carotenoides ocasiona mudanças do pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento das leveduras e a liberação de compostos como, por exemplo, ácido acético, álcool ou intermediário do ciclo do ácido cítrico durante o sua fase de adaptação, ocasionando a queda no pH. Esse intermediário é posteriormente reassimilado e estimula uma intensa carotenogênese, que resultará no aumento do pH. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final do processo fermentativo. Além disso, verificou-se que uma parte dos açúcares foram consumidos para a biossíntese carotenogênica, alcançando uma produção de carotenoides $486,06 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($58,79 \mu\text{g.g}^{-1}$) em 168 h com uma biomassa de $8,27 \text{g.L}^{-1}$.

Na literatura, alguns trabalhos relatam a utilização de diferentes substratos e condições de processos para bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*. Maldonado et al. (2007), isolou e identificou a levedura *Sporobolomyces roseus* na qual realizou o cultivo em meio complexo comercial (YM) onde a produção alcançou $237 \mu\text{g.L}^{-1}$ em carotenoides com $3,3 \text{g.L}^{-1}$ de biomassa. A utilização de meios complexos (fontes alternativas de nutrientes) pode apresenta uma produção equivalente ou superior aos meios complexos comerciais.

No screening realizado por Libkind e Broock (2006) para *Sporidiobolus longiusculus* foi constatado uma produção de $846 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($168 \mu\text{g.g}^{-1}$) com 4.9 de biomassa em meio formulado 10g.L^{-1} de glicose, 2g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2g.L^{-1} , 2g.L^{-1} de $\text{KH}_2(\text{PO}_4)\text{O}$, $0,5 \text{g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,1 \text{g.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1g.L^{-1} de extrato de levedura, a 25°C , 25 rpm por 72 h, e pH inicial 5,0. Valduga (2008) realizou um planejamento com melaço de cana de açúcar ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) pré trato com ácido fosfórico (1N), e hidrolisado de levedura ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$), onde verificou uma produção de $580.59 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($196.81 \mu\text{g.g}^{-1}$) $2.95 (\mu\text{g.L}^{-1})$ de biomassa.

Na extração dos pigmentos, a temperatura é um dos fatores mais importantes, podendo afetar as propriedades físico-químicas como atividade oxidante e a coloração. Na Figura 3 percebe-se o efeito negativo na recuperação de carotenoides quando a temperatura de exposição é acima de 25°C , onde a $27,5^\circ\text{C}$ ocorre uma perda de 11,43 % e a 55°C a degradação corresponde 77,7 %, quando comparados ao tratamento a 25°C . Sabe-se que os carotenoides são substâncias reativas que apresentam degradação por fatores como ácidos, luz e temperatura. Dessa forma, a seleção das condições de operação (temperatura de extração) podem minimizar as alterações, possibilitando a obtenção de produtos de qualidade (OLIVEIRA et al., 2011).

O método de secagem é uma técnica antiga para preservação de alimentos, entretanto existem diversos tipos de secagem como leito fixo ou liofilização na qual estes promovem uma desidratação na amostra e podem interferir diretamente no grau dos constituindo do produto, podendo remover mais água ou acarretar maior dano nas propriedades nos alimentos (SANTOS et al., 2012).

Percebe-se na Tabela 1 que o método de secagem por liofilização apresenta uma recuperação maior dos carotenoides se comparado a secagem por estufa de circulação de ar forçado. Além de verificar que a recuperação de carotenoides da biomassa sem maceração apresenta um ganho de aproximadamente 20%, comparando com a biomassa macerada. Confrontando estes dados com o método de secagem convencional percebe ganho de cerca de 44% aproximadamente, quando trabalhado com liofilização sem maceração.

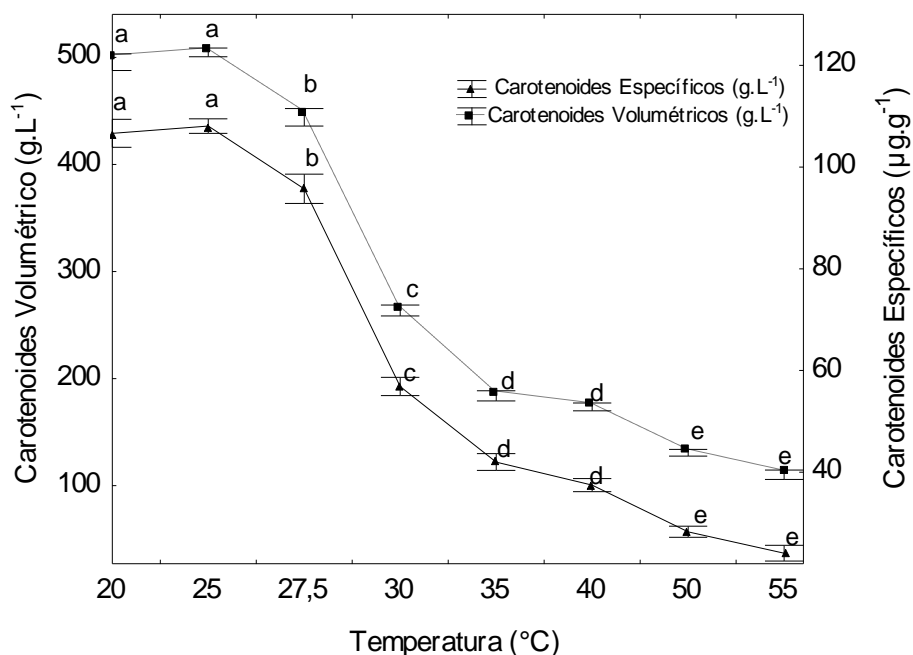


Figura 2: Extração por diferentes temperaturas da biomassa da levedura *S. pararoseus* em meio de cultivo contendo glicerol (20 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (20 g.L⁻¹), a 25°C, 180 rpm em 168 h.

Sabe-se que a o processo de liofilização remove a água livre do sistema, e no processo de trituração da amostra com o grau gera atrito liberando calor, provocando possivelmente uma redução desse carotenoide. Além desse procedimento verifica-se quando a biomassa é padronizada pela peneira (mesh 125) ocorre uma maior exposição dessa amostra com o ambiente bem como a redução do diâmetro da partícula ocorrendo um aumento no contata da superfície com a umidade, tendo uma rápida absorção, devido o material ser hidrocópico, na qual estes fatores interferiram no processo de liofilização quando se reduz o tamanho da partícula. De acordo com Oliveira et al. (2011) investigou o comportamento higroscópico da fruta sapoti (*Achras sapota L.*) liofilizado em isotermas de adsorção, onde constatou que o pó apresenta um absorção maior da umidade promovendo um aumento na atividade de água, na qual atribui a fatores como porosidade presente do pó, bem como a compostos solúveis presente na fruta.

Tabela 1: Métodos de secagem e influência da maceração

Tipo de tratamento	Carot. Específico	Carot. Volumétrico
Secagem em estufa (25°C)	58,79±3,36 ^c	486,06±27,75 ^c
Liofilização sem maceração (-80°C)	105,24±3,14 ^a	870,04±25,97 ^a
Liofilização com maceração (-80°C)	85,27±10,65 ^b	704,99±88,01 ^b

Letras minúsculas distintas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), n: 3.

Segundo Santos et al. (2012), verificou que a desidratação em leito fixo provocou perde de carotenoide no coentro, apresentando valores de 2,47 mg.g⁻¹ e na liofilização foi de 2,02 mg.g⁻¹, esta diferença entres os tratamento é decorrente da temperatura de exposição que provoca degradação nos constituintes, sendo que Mariano (2005) verificou que perdas de β-caroteno em pequi de 30,83%, 32,0% e 43,90% quando expostos a temperatura de 60, 70 e 105°C, demonstrando que este biomolécula apresenta além de sensibilidade a temperatura outros como luz e acidez.

Esforços tem demonstrado à utilização de leveduras para a produção em escala indústria utilizando substratos complexos (fontes alternativas de nutrientes) para sua comercialização como corante alimentício ou suplemento nutricional. É imprescindível o estudo na área de bioprocessos a fim de dominar corretamente os parâmetros para se alcançar uma resposta satisfatória (VALDUGA et al., 2011).

4. CONCLUSÕES

Pode verificar que o crescimento celular, a quantidade de açúcares redutores disponíveis no início do cultivo foi rapidamente consumida, evidenciando alta produtividade em carotenoides. Pode constatar que a temperatura de exposição máxima, para minimizar perdas na extração dos carotenoides produzidos pela levedura *S. pararoseus* é 25°C. Um aumento de 44% na recuperação de carotenoides, é alcançado quando o processo de secagem da biomassa foi por liofilização comparado ao método de secagem em estufa com circulação de ar.

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.

REFERÊNCIAS

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

ABEROUHAND, A. A. A. *Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. World Journal of Dairy & Food Science*, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2011.

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.

BARNWAL, P.; TIWARI, G. N. *Grape drying by using hybrid photovoltaic-thermal (PV/T) greenhouse dryer: An experimental study. Solar Energy*, v. 82, n. 12, p. 1131-1144, 2008.

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. *Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais. Rio Grande – RS, 2012, 138p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).*

COELHO, A.R.; CELLI, M. G.; ONO, E. Y. S.; WOSIACKI, G.; HOFFMANN, F. L.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation in vitro. *Arquivo Brasileiro de Biologia e Tecnologia*, v.50, n. 4, p. 725-733, 2007.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press. v.2, p.39-165,1976.

FARHI, M.; MARHEVKA, E.; MASCI, T.; MARCOS, E.; EYAL, Y.; OVADIS, M.; ABELIOVICH, H.; VAINSTEIN, A. *Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids*. *Metabolic Engineering*, v. 13, n. 5, p. 474-481, 2011.

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.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, D.; GRIGOROVA, D. *Formation of carotenoids by Rhodotorula glutinis in whey ultrafiltrate*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, n. 8, p. 888-894, 1994.

HUANG, J. C.; ZHONG, Y. J.; LIU, J.; SANDMANN, G.; CHEN, F. *Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin*. *Metabolic Engineering*, v. 17, n. 1, p. 59-67, 2013.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; PHILIPPE, J. B. *Growth kinetics and astaxanthin production of Phaffia rhodozyma on glycerol as a carbon source during batch fermentation*. *Biotechnology Letters*, v. 20, n.10, p. 929-934, 1998.

KASPER, J. C.; WIGGENHORN, M.; RESCH, M.; FRIESS, W. *Implementation and evaluation of an optical fiber system as novel process monitoring tool during lyophilization*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, n. 3, p. 449-459, 2013.

LIBKIND, D.; BROOCK, M. V. *Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, n. 7, p. 687-692, 2006.

MARIANO, R. G. Comparação da perda percentual de β -caroteno no pequi (*Caryocar brasiliense*) desidratado a 60 °C, 70 °C e 105 °C. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 20, 2006, Curitiba. **Anais...** Curitiba: TECART, 2006.

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.

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

MILLER, G. L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

OLIVEIRA, V. S.; AFONSO, M. R.; COSTA, J. M. C. *Physico chemical and hygroscopic behavior of Sapodilla lyophilized. Revista Ciência Agrônômica. v. 42, n.2, 2011.*

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

PERALTA-YAHYA, P. P.; OUELLET, M.; CHAN, R.; MUKHOPADHYAY, A.; KEASLING, J. D.; LEE, T. S. *Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. Nature Communications, v. 2, n. 483, p. 1-8, 2011.*

REYES, L. H.; GOMEZ, J. M.; KAO, K. C. *Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. Metabolic Engineering, v. 21, n. 1, p. 26-33, 2014*

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. *Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. Brazilian Journal of Microbiolog, v. 43, n. 2, p. 432-440, 2012.*

SANTOS, G.; OLIVEIRA, M. C.; MORAES, M. H.; PAGANI, A. A. C. *Comparative study of coriander coriander (Coriandrum sativum L.) obtained in dry different dryng method, Revista Geintec, v. 2 , n. 3, p. 236-244, 2012.*

SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos. Campinas - SP, 2004, 134p. *Tese (Pós- Graduação em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.*

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.; JÚNIOR, A. F. *Study of the bio-production of carotenoids by Sporidiobolus salmonicolor (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 83, n. 9 p. 1267-1274, 2008.*

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

VALDUGA, E.; SCHWARTZ, C. R. M.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H. *Evaluation of aeration and substrate concentration on the production of carotenoids by Sporidiobolus salmonicolor (CBS 2636) in bioreactor. European Food Research and Technology, v. 232, n. 3, p. 453-462, 2011.*

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A. H. R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. *Carotenoids production from a newly isolated Sporidiobolus pararoseus strain using agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Doi: 10.1016/j.bcab.2013.10.001, 2013.*

ZEB, A.; MURKOVIC, M. *Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. Food Chemistry, v. 127, n. 4, p. 1584-1593, 2011.*

ZHAO, J.; LI, Q.; SUN, T.; ZHU, X.; XU, H.; TANG, J.; ZHANG, X.; MA, Y.
Engineering central metabolic modules of Escherichia coli for improving β -carotene production. Metabolic Engineering, v. 17, n. 1, p. 42-50, 2013.