

INFLUÊNCIA DE PRÉ-TRATAMENTOS NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES EM MEIO AGROINDUSTRIAL POR *SPORODILOBOLUS PARAROSEUS*

Whallans Raphael Couto Machado (FURG) E-mail: whallansfm@hotmail.com
Mario Henrique Gonzalez (UNESP) E-mail: mario.henrique.gonzalez@gmail.com
Janaina Fernandes de Medeiros Burkert (FURG) E-mail: jfmb@vetorial.net

Resumo: Os carotenoides podem ser obtidos por processos químicos ou biologicamente por microorganismos, com destaque para *Sporidiobolus pararoseus*, apresentando crescente interesse nesta via de obtenção em função da grande aplicabilidade desses biocompostos. Esta levedura é promissora para cultivos submersos, apresentando fácil assimilação de coprodutos agroindustriais, fontes alternativas de carbono e nitrogênio, usados como substratos nos meios de produção. Neste estudo, avaliou-se o uso de um pré-tratamento químico (ácido sulfúrico ou fosfórico) ou físico (carvão ativo) nos substratos alternativos para a bioprodução de carotenoides, usando a *S. pararoseus*. Nas condições de processo a 25 °C, 180 rpm em 168 h com o meio de produção agroindustrial 40 g/L de melação de cana de açúcar e 6,5 g/L de água de maceração de milho pré-tratado com ácido sulfúrico foi possível alcançar 936,35 µg/L (79,63 µg/g) de carotenoides totais, 12,02 g/L de biomassa e produtividade em carotenoide (Pc) de 5,57 µg/L.h (0,47 µg/g.h). A bioprodução de carotenoides alcançou 812,32 µg/L (72,35 µg/g), 11,27 g/L de biomassa e Pc de 4,83 µg/L.h (0,43 µg/g.h) para ácido fosfórico. Portanto, os pré-tratamentos com ácido sulfúrico e ácido fosfórico nos substratos agroindustriais foram promissores e promoveram incrementos superiores a 55% e 79% na concentração de carotenoides totais, respectivamente.

Palavras-chave: Água de maceração de milho, cultivo submerso, melação de cana de açúcar, levedura vermelha.

INFLUENCE OF PRE-TREATMENTS IN THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS IN AGRO-INDUSTRIAL MEDIUM BY *SPORODILOBOLUS PARAROSEUS*

Abstract: Carotenoids may be either obtained by chemical processes or yielded biologically by microorganisms, mainly *Sporidiobolus pararoseus*. The latter has drawn much interest lately because biocompounds are widely applicable. This yeast is promising in submerged cultures since it easily assimilates agroindustrial byproducts, which are alternative sources of carbon and nitrogen that are used as substrates in production media. This study aimed at evaluating the use of chemical (sulfuric and phosphoric acids) and physical (activated carbon) pre-treatments of alternative substrates in the bioproduction of carotenoids by *S. pararoseus*. In process conditions at 25°C and 180 rpm for 168h with the agroindustrial production medium which consisted of 40 g/L sugarcane molasses and 6.5 g/L corn steep liquor, pre-treated with sulfuric acid, the following values were found: 936.35 µg/L (79.63 µg/g) total carotenoids; 12.02 g/L biomass; and 5.57 µg/L.h (0.47 µg/g.h) productivity in carotenoid (Pc). Bioproduction of carotenoids reached 812.32 µg/L (72.35 µg/g), biomass was 11.27 g/L and Pc was 4.83 µg/L.h (0.43 µg/g.h) for phosphoric acid. Therefore, pre-treatments of agroindustrial substrates with both sulfuric and phosphoric acids were promising and led to increments of around 55% and 79% in the concentration of total carotenoids, respectively.

Keywords: Corn steep liquor, submerged cultive, sugar cane molasses, red yeast.

1. Introdução

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis que apresentam coloração variando do amarelo ao vermelho amplamente aplicados na indústria farmacêutica, como suplementos dietéticos e corantes alimentares (NIU et al., 2017). Devido sua capacidade de colorir, os carotenoides podem influenciar a aceitabilidade de muitos alimentos

(KONOPACKA et al., 2017). Os carotenoides são conhecidos pela promoção da saúde devido a sua atividade anticancerígena (HOU e CUI, 2018), prevenção de doenças cardiovasculares (KULCZYŃSKI et al., 2017), catarata (KAUR et al., 2017) e certos tipos de diabetes (ROOHBAKHSH et al., 2017). Entretanto estes benefícios são observados em uma alimentação variada de produtos contendo estes pigmentos, ou através de suplementos.

O faturamento da comercialização dos carotenoides foi de 1,24 bilhões em 2016, tendo expectativas para 2021 de 1,53 bilhões, apresentando uma taxa anual de 3,78% de 2016 para 2021 (MARKETS e MARKETS, 2016). Entretanto, o mercado mundial vem sendo abastecido por compostos químicos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes aos corantes naturais, porém, a síntese destas moléculas podem apresentar risco potencial à saúde, desencadeando processos alergênicos e/ou cancerígenos (FEKETE e TSABOURI, 2017). Portanto, ampliando a procura por novas fontes naturais de carotenoides e impulsionando a importância da pesquisa da obtenção biotecnológica microbiana, como uma fonte alternativa/sustentável para obtenção de corantes naturais.

O uso de micro-organismos em especial as leveduras é potencial para aplicação na obtenção de carotenoides (CIPOLATTI et al., 2015; LOPES et al., 2017; MACHADO e BURKERT, 2015; RIOS et al., 2015; SILVA et al., 2016), uma vez que oferecem algumas vantagens em comparação às fontes convencionais de obtenção (vegetais): A produção não é sazonal, exige pouca área de cultivo, não é influenciada pelas condições exógenas e apresenta exigência nutricional simples, podendo assimilar resíduos agrícolas para produção de diferentes compostos (CHENG; YANG, 2016). Além disso, as leveduras vêm recebendo atenção pelos vários biocompostos benéficos que podem ser obtidos paralelamente ao biocorante, como lipídeos, vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados, antimicrobianos e exopolissacarídeos (HAN et al., 2016; MANOWATTANA et al., 2018; YOO; ALNAEELI e PARK, 2016).

O Brasil apresenta uma diversidade de coprodutos agroindustriais em abundância como melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho (CSL), com grande apelo econômico e ecológico, podendo ser utilizado como substratos para meio de cultivo, como fontes de carbono e nitrogênio alternativas, por diferentes micro-organismos para obtenção de bioprodutos (MACHADO e BURKERT, 2015; VALDUGA et al., 2014).

O melaço de cana de açúcar é um subproduto da indústria açucareira que vem sendo empregado como meio de cultivo nos processos fermentativos, produzindo uma variedade de bioprodutos como etanol (ARSHAD et al., 2017), biohidrogênio (KAYAHAN; et al., 2017), ácidos orgânicos (PAN et al., 2017), ácidos graxos (ZHENG et al., 2015) e solventes orgânicos (DESHMUKH et al., 2016). Este substrato contém aproximadamente 20% de água, 50% de açúcar total (sacarose, glicose e frutose), 10% de sais inorgânicos, contendo íons tais como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , etc., 10% de cinzas, proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos (TASKIN et al., 2016). A produção de melaço de cana de açúcar no Brasil é estimada para o ano de 2018 em 0,24 bilhões de toneladas (MISCHOPOULOU et al., 2016).

A água de maceração de milho é um coproduto da moagem do milho úmido, que contém 40–50% de sólidos solúveis, constitui de uma mistura de açúcares redutores, aminoácidos, vitamina do complexo B e uma variedade de mineiras como K, P, Mg, Na, Ca, Fe, Zn, Mn, Cr, Cu (GAO e YUAN, 2011; VECINO et al., 2015). O potencial desse coproduto já foi verificado para obtenção de biossurfactantes (VECINO et al., 2015), vitaminas do complexo B (XIA et al., 2015), ácidos (YU et al., 2015), álcoois gordurosos (FILLET et al., 2015), enzimas (WANG et al., 2014b) e biocombustível

(FARIAS et al., 2016) por diferentes micro-organismos. A combinação dessa fonte de nitrogênio com melaço de cana de açúcar pode desenvolver um meio cultivo eficiente por apresentar uma mistura rica de diferentes nutrientes.

Dessa forma, o reaproveitamento destes coprodutos oriundos das cadeias produtivas podem possibilitar a minimização de custos com o meio de produção, representando uma forma de sustentabilidade, permitindo um equilíbrio entre produção e qualidade ambiental. Portanto, promovendo uma diminuição da necessidade de biorremediação e desintoxicação biológica desses coprodutos, minimizando os volumes de rejeitos industriais gerados, além de sua conversão em produtos de maior valor agregado (EZEJIOFOR et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2007).

Por outro lado, os meios agroindustriais possuem composição variável devido a sua complexidade e açúcares de difícil acesso, o que pode ser responsável pela inibição de algumas leveduras (SGUAREZI et al., 2009). Altas concentrações de metais pesados nos meios de cultivo podem resultar graves problemas durante o processo, tais como retardamento do crescimento microbiano, produção de outros bioprodutos que podem ocasionar intoxicação do inóculo e interferência do pH (BERWANGER et al., 2006; ROUKAS, 1998). Entretanto estes contaminantes encontrados nos meios agroindustriais podem ser removidos parcialmente com pré-tratamentos adequados possibilitando meios com aspecto clarificado, não provocando interferência no cultivo submerso e promovendo uma produtividade maior que os meios sem pré-tratamentos.

O ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ferrocianeto de potássio, fosfato tricálcico, e ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sal dissódico, carvão ativo, filtração (gases e algodão), resina de troca catiônica e membrana modificada são relatados como pré-tratamentos aos coprodutos agroindustriais constituintes de meios de cultivos como melaço de cana de açúcar, melaço de beterraba, resíduo texturizado de soja, água de maceração de milho e palha de arroz, em diferentes condições de processo, alcançando um incremento da produção comparado ao meio sem pré-tratamento (AI et al., 2015; COLET et al., 2017; SGUAREZI et al., 2009; VALDUGA et al., 2014).

Assim, a correta adaptação destes pré-tratamentos para os meios de cultivo tem grande relevância, podendo garantir um aumento da viabilidade econômica para obtenção dos bioprodutos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi utilizar três pré-tratamentos no melaço de cana de açúcar e na água de maceração de milho, de modo a promover uma melhor clarificação e remoção de possíveis interferentes para potencializar uma eficiência na bioconversão em carotenoides pela levedura *S. pararoseus*.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Microrganismo

A levedura *S. pararoseus* utilizada neste trabalho foi previamente isolada de amostras ambientais do ecossistema da região do Escudo Sul-Rio-Grandense (Rio Grande do Sul), identificadas e depositadas na Coleção de Culturas Tropicais André Toselo (CCT 7689). estuda em trabalhos anteriores (LOPES et al., 2017; MACHADO e BURKERT, 2015).

2.2. Manutenção e reativação do micro-organismo

O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo ágar GYMP inclinado (2,0 g/L de glicose, 1,0 g/L de extrato de malte, 0,5 g/L de extrato de levedura, 0,2 g/L de NaH_2PO_4 e 1,8 g/L de ágar) recoberto com uma camada de óleo mineral acima do ágar, mantido sob refrigeração a 4 °C por 3 meses (FONSECA e RAFAEL, 2011). Para a reativação, as colônias recobertas pela camada de óleo mineral foram repicadas em tubos com ágar YM inclinado e incubadas a 25 °C durante 48 h, repetindo esse processo por duas vezes. Após este período, foi adicionado 1 mL de água peptonada estéril para obter uma suspensão celular, que foi transferida para tubos de ensaio com 9 mL de caldo YM (3,0 g/L de extrato de levedura, 3,0 g/L de extrato de malte, 5,0 g/L de peptona, 10,0 g/L de glicose, adicionado a 0,2 g/L de KNO_3), mantidas à 25 °C por 48 h (PARAJÓ et al., 1998).

2.3. Substratos Agroindustriais

Os substratos agroindustriais usados foram fornecidos pela indústria na região. A fonte de carbono foi o melaço de cana-de-açúcar (Guimarães Indústria e Comércio Ltda. - RS) e a água de maceração de milho (Balsa Nova - PR) proveniente da moagem de milho úmido, foi utilizada como fonte de nitrogênio, anteriormente caracterizado (CIPOLATTI et al., 2015).

2.4. Preparação de Inoculo

Um mililitro de água peptonada (0,1%) estéril foi prepara para realizar uma suspensão de células a partir dos tubos contendo o *S. pararoseus* em ágar YM inclinado e adicionada a 9,0 mL de meio YM e incubada a 25 °C durante 48 h. O inóculo foi cultivado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 90 mL de meio YM, previamente esterilizado a 121 °C por 15 min, a suspensão celular foi adicionada e incubada à 25 °C, 150 rpm por 48 h ou o tempo necessário para atingir 1×10^7 células/mL, contas por meio da câmara de Neubauer (MICHELON et al., 2012).

2.5. Pré-tratamentos nos substratos com carvão ativo

Nos ensaios que usaram pré-tratamento com carvão ativo granular 1–2mm (Labsynth) foi utilizado uma concentração de 8% (p/v) em frascos com agitação 150 rpm durante 1 h de contato a 90 °C segundo Valduga et al. (2007). Esta condição de pré-tratamento foi aplicada para meio previamente otimizado (MACHADO e BURKERT, 2015) com os substratos melaço de cana de açúcar (MEL = 40 g/L) e água de maceração de milho (CSL = 6,5 g/L), separadamente. Após o pré-tratamento os substratos foram centrifugados ($3439 \times g$) por 10 min e filtrados por um funil sobre um balão kitasato, adaptando uma coluna de filtração, composta de papel de filtro, 3,5 g de terra diatomácea (tendo um efeito de filtro físico) e uma camada de algodão, acoplado a uma bomba a vácuo, para remoção de partículas de carvão.

2.6. Pré tratamento nos substratos com ácido sulfúrico ou ácido fosfórico

Os ensaios com tratamento ácido foram realizados de acordo com Sguarezi et al. (2009) e Valduga et al., (2007). O meio formulado com os substratos melaço de cana de açúcar (MEL = 40 g/L) e água de maceração de milho (CSL = 6,5 g/L) foram ajustados a pH 3,0 com ácido sulfúrico 1N ou ácido fosfórico 1N, separadamente. Os meios

permaneceram em repouso por 24 h a temperatura ambiente, e após foi realizado uma centrifugação a 3439 x g por 10 min, ajustando seu pH para 6.0 com solução de NaOH (ROUKAS, 1998).

2.7. Cultivo em frascos agitados

As culturas para a bioprodução de carotenoides foram preparadas em frascos Erlenmeyers de 500 mL com 250 mL de meio de cultura previamente otimizado (MACHADO e BURKERT, 2015) pré-tratados e sem pré-tratamentos. A esterilização do meio foi a 121 ° C por 15 min, com adição de 10% de inóculo (cultivo inicial com 1×10^7 células/mL), sob condições de operação a 25 °C, 180 rpm (agitador orbital, modelo Tecnal TE 424), sem iluminação por 168 h (FONSECA e RAFAEL, 2011; MICHELON et al., 2012). As amostras foram coletadas a cada 24 h para monitorar a concentração de biomassa, o pH e os carotenoides totais.

2.8. Recuperação de carotenoides totais

A recuperação dos carotenoides totais começou com a centrifugação da biomassa (3439 x g por 10 min), que foi então transferida para uma placa de Petri e colocada em um estufa de circulação de ar (35 °C por 48 h) (FONSECA e RAFAEL, 2011). A parti da amostra seca foi macerada em um grau, padronizada em uma peneira de malha 115 e congelado a -18 °C por 48 h (CIPOLATTI et al., 2015). Uma vez congelada, a biomassa foi rompida por um agente de ruptura dimetilsulfóxido - DMSO ((CH₃)₂SO), seguido por vortex durante 1 min em intervalos de 15 min, um total de 1 h (FONSECA e RAFAEL, 2011). Após a ruptura, adicionou-se acetona, seguida de centrifugação (3439 x g durante 10 min). O sobrenadante foi separado e sucessivas extrações foram realizadas até o branqueamento total da célula.

Nas fases de solvente, obtidas a partir da centrifugação, foram adicionados 20% de solução de NaCl (p/v) e éter de petróleo. Após a formação das duas fases, a fase polar foi coletada e a água foi removida com sulfato de sódio (Na₂SO₄), formando extratos carotenogênicos (MICHELON et al., 2012).

2.9. Determinação de carotenoides totais

A concentração de carotenoides totais nos extratos foram determinadas utilizando um espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China) através da absorbância média máxima a 448 nm expressa em termos de carotenoide majoritário (β -caroteno em éter de petróleo com absorvidade específica de $A_{1cm}^{1\%} = 2592$) usando a equação 1 (DAVIES, 1976).

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

Onde CT é a concentração específica de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$), A é a absorvância, V é o volume (mL), $m_{amostra}$ é a massa celular seca (g) e $A_{1cm}^{1\%}$ é a absorvância específica. Para o cálculo da concentração 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).

2.10. Determinação do pH

O pH foi determinado pela leitura da amostra em um potenciômetro, de acordo com a AOAC (2012).

2.11. Determinação da concentração de biomassa

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

2.12. Determinação dos minerais

Os micronutrientes Mn, Zn, Fe e Cu nos substratos agroindustriais foram determinados por espectrometria de absorção atômica de chama-FAAS (Varian Spectra AA-55), de acordo com AOAC (2012).

2.13. Análise estatística

Todos os tratamentos foram realizados em triplicado. Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para verificar a existência de diferenças significativas nos tratamentos com nível de confiança de 95%, utilizando o software Statistica® (versão 10.0), StatSoft, Inc., EUA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Influência dos pré-tratamentos sobre os minerais presentes nos meios de produção agroindustriais

O meio agroindustrial sem pré-tratamento (MEL+CSL₀) apresentou concentrações de Fe, Cu, Zn e Mn superiores aos meios com os pré-tratamentos (Tabela 1). Uma perda de aproximadamente 68% do Fe para ambos pré-tratamentos com ácidos foi verificada. Enquanto que para o Cu foi observado uma redução de 26% e 13%, quando pré-tratado com ácido sulfúrico e ácido fosfórico, respectivamente.

Tabela 1 – Componentes minerais do meio de cultivo agroindustrial antes e após os pré-tratamentos

Minerais	Pre-treatments			
	MEL+CSL ₀	MEL+CSL ₁	MEL+CSL ₂	MEL+CSL ₃
Fe (mg/L)	2.048±0.012 ^a	0.660±0.009 ^b	0.644±0.033 ^b	0.058±0.017 ^c
Cu (mg/L)	0.070±0.001 ^a	0.052±0.003 ^c	0.061±0.002 ^b	0.053±0.001 ^{bc}
Zn (mg/L)	0.333±0.002 ^a	0.078±0.002 ^b	< LOD	< LOD
Mn (mg/L)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Média ± desvio padrão (n=3); Letras diferentes nas mesmas linhas representam diferenças significativas ($p < 0.05$); CSL = água de maceração de milho; MEL = melaço de cana-de-açúcar; MEL+CSL₀ = sem pré-tratamento; MEL+CSL₁ = tratamento com ácido sulfúrico; MEL+CSL₂ = tratamento com ácido fosfórico e MEL+CSL₃ = tratamento com carvão ativo. LOD = limite de detecção.

O pré-tratamento com carvão ativo (MEL+CSL₃) para o meio de cultivo (Tabela 1) promoveu o maior sequestro ou perdas totais de minerais, além das partículas de carvão

que permaneceram nos substratos após a etapa de filtração (observado visualmente), o que poderia dificultar substancialmente o seu uso para este processo em um escalonamento industrial.

O carvão ativo é considerado como um tratamento superior nos processos de adsorção, devido a sua área de superficial elevada, reatividade da superfície, volume de poro elevado, estrutura porosa bem desenvolvida e presença de grupos funcionais na sua superfície, promovendo a eficiência na remoção de alvos de soluções aquosa. Porém, uma desvantagem da adsorção é a falta de sua seletividade na remoção de constituintes nutricionais (SARIOL et al., 2016), comportamento observado neste trabalho para Fe, Cu, Zn e Mn.

3.2. Bioprodução de carotenoides

O comportamento do pH ao longo da bioprodução de carotenoides no meio com melaço (40 g/L) e água de maceração de milho (6,5 g/L) em geral apresentou uma queda inicial característica nas primeiras horas de cultivo (até 12 h), exceto para o pré-tratamento com carvão ativo, aumentando até aproximadamente 48 a 72 h e permanecendo praticamente constante até o final do processo (Figura 1b). Machado e Burkert (2015), verificaram este mesmo comportamento utilizando meios de produção sem pré-tratamento, onde a queda nas primeiras horas é devido à adaptação da levedura a uma condição de agitação e o desenvolvimento do crescimento celular, que provoca a liberação de compostos orgânicos como ácido acético, álcool ou intermediários do clico do ácido cítrico, ocasionando a queda do 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 cultivo. Este comportamento similar já foi observado anteriormente para outros micro-organismos produtores de carotenoides (FRENGOVA et al., 1994; RIOS et al., 2015; SILVA et al., 2016).

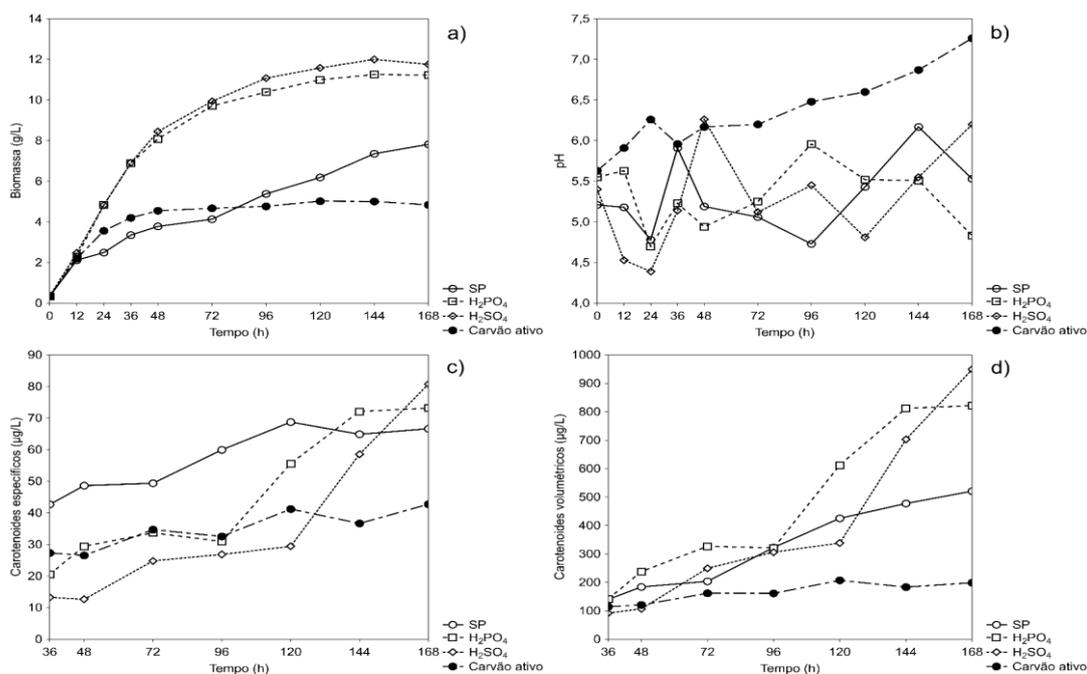


Figura 1 – Cinética do crescimento celular (a), evolução do pH inicial (b), produção específica de carotenoides (c) e produção volumétrica de carotenoides (d) por *S. pararoseus* ao longo de 168h, a 25 °C e 180rpm, com melaço (40 g/L) e água de maceração de milho (6,5 g/L) nos meios de cultivo sob diferentes pré tratamentos, sendo realizado em triplicata. SP: sem pré - tratamento no meio.

Dentre os três pré tratamentos o carvão ativo apresentou um aspecto de maior clarificação visual dos coprodutos agroindustriais, porém, alcançou o menor crescimento celular que ocorreu até às 48 h (5,04 g/L em Figura 1a e Tabela 2) permanecendo constante até o final do processo. Além disso, alcançou a menor produção de carotenoides deste estudo com 206,84 µg/L e 41,17 µg/g (Figura 1c, Figura 1d e Tabela 2). Provavelmente, o pré-tratamento físico além de remover possíveis metais pesados pode ter absorvido nutrientes importantes, como o Cu e Fe (Tabela 1 em MEL+CSL₃) que sofreram uma diminuição em cerca de 24% e 72%, respectivamente, após este pré-tratamento, e Zn que não foi possível determinar as perdas, em função do limite de detecção do método. Outro fator que pode promover a baixa produção de células foi à presença de partículas de carvão, não totalmente removidas com a coluna de filtração e a centrifugação. Possivelmente, estas partículas sólidas no meio de produção promoveram um retardo na biossíntese celular, bem como também o cisalhamento da parede celular das leveduras, devido o processo de constante agitação. Comportamento similar de inibição na produção de carotenoides por *S. salmonicolor* CBS 2636 para um meio com melaço, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho pré tratados com carvão ativo (5% por 60 min a 90 °C) também foi observado por Valduga et al., (2007), constatando perdas consideradas de minerais como Zn (92%), N (80%), P (80%), Cu (70%) e Fe (70%) além de K (18) e Mg (24%). Este mesmo efeito também foi verificado para outras leveduras e outros bioprodutos pré-tratados com carvão ativo (SGUAREZI et al., 2009).

Tabela 2 – Teste de Tukey para os diferentes pré tratamentos no meio de cultivo para bioprodução de carotenoides.

Tratamento	Carotenoides		Biomassa	Produtividade	
	Volumétrico (µg/L)	Específico (µg/g)	(g/L)	Volumétrico (µg/L.h)	Específico (µg/g.h)
SP*	522.62 ± 3.74 ^c	66.87 ± 0.48 ^b	7.85 ± 0.02 ^b	3.11 ± 0.02 ^c	0.398 ± <0.01 ^b
H ₃ PO ₄	812.32 ± 5.37 ^b	72.35 ± 5.37 ^{ab}	11.27 ± 0.16 ^a	4.83 ± 0.36 ^b	0.430 ± 0.03 ^{ab}
H ₂ SO ₄	936.35 ± 3.07 ^a	79.63 ± 3.07 ^a	12.02 ± 0.71 ^a	5.57 ± 0.22 ^a	0.474 ± 0.02 ^a
Carvão	206.84 ± 0.87 ^d	41.17 ± 0.87 ^c	5.04 ± 0.06 ^c	1.73 ± 0.04 ^d	0.343 ± 0.01 ^c

Média ± desvio padrão (n=3); Letras diferentes nas mesmas linhas representam diferenças significativas ($p < 0.05$). SP* = sem pré tratamento no meio de cultivo.

Os pré-tratamentos ácidos (Figura 1a e Tabela 2) proporcionaram uma maior produção de biomassa de 11,27 g/L e 12,02 g/L, para ácido fosfórico e sulfúrico representando um ganho de aproximadamente 43% e 53% em relação ao cultivo sem pré-tratamento em 168h. Estes pré-tratamentos ácidos também possibilitaram uma maior produção carotenogênica (Figura 1c, Figura 1d e Tabela 2) de 936,35 µg/L (79,63 µg/g) e 812,32 µg/L (72,35 µg/g) para o ácido sulfúrico e ácido fosfórico, respectivamente, superiores a 55% e 79% ao cultivo sem pré-tratamento. Portanto, as perdas de minerais ocorridas com estes pré-tratamentos não influenciaram negativamente na produção de biomassa e carotenoides. Possivelmente ocorreu uma redução de contaminantes presentes nos substratos agroindustriais como alguns metais pesados, também observado por Valduga et al., (2007), beneficiando a bioprodução carotenogênica.

O aproveitamento de substratos alternativos de menor custo com a utilização de pré-tratamentos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, porque possibilita ganhos

significativos e a redução de custos na bioprodução de diferentes compostos. O uso de ácido sulfúrico para pré-tratamento no melaço de cana de açúcar na obtenção de gomas por *Alcaligenes* sp. proporcionou um aumento de 50% na produção (AI et al., 2015).

Comportamento similar ao deste trabalho quanto ao efeito positivo da aplicação de diferentes pré-tratamentos provavelmente provocando uma redução de contaminantes, como metais pesados nos substratos agroindustriais, que interferiam no crescimento microbiano foi verificado por Roukas (1998). O ácido sulfúrico apresentou destaque no pré-tratamento do melaço de beterraba para produção de pululana por *Aureobasidium pullulans* alcançando um incremento na produção de 47%. Por outro lado, o pré-tratamento com ácido acético na casca de arroz usada como fonte de carbono na produção de pululana por *Aurantiochytrium* sp. exerceu efeito negativo (WANG et al., 2014a).

A produção de carotenoides obtida neste trabalho com o uso do pré-tratamento com ácido sulfúrico (936,35 µg/L) e ácido fosfórico (812,32 µg/L) por *S. pararoseus* foi superior ao alcançado por Valduga et al. (2007) com o pré-tratamento ácido (541,5 µg/L), em meio de produção contendo melaço de cana de açúcar, água de maceração de milho e hidrolisado de levedura, porém, com o micro-organismo *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636).

4. Conclusão

O uso dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico ou ácido fosfórico nos substratos agroindustriais melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho para bioprodução de carotenoides por *S. pararoseus* foram promissores possibilitando um incremento de 55% e 79% na concentração de carotenoides totais, respectivamente. Portanto, provavelmente contribuindo para minimização dos custos com o meio de produção para obtenção de carotenoides microbianos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES (Agência Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Pós-Graduação) e ao CNPq (Conselho Nacional de Ciência e Desenvolvimento Tecnológico) pelo seu apoio financeiro.

Conflito de Interesses

Os autores não declararam qualquer conflito de interesse.

Referências

- AI, H.; LIU, M.; YU, P.; ZHANG, S.; SUO, Y.; LUO, P.; LI, S. & WANG, J. *Improved welan gum production by Alcaligenes sp. ATCC31555 from pretreated cane molasses*. Carbohydrate Polymers Vol. 129, p.35–43, 2015.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed. USA: Association of Official Analysis Chemists International., 2012.
- ARSAD, M.; HUSSAIN, T.; IQBAL, M. & ABBAS, M. *Enhanced ethanol production at commercial scale from molasses using high gravity technology by mutant*

S. cerevisiae. Brazilian Journal of Microbiology Vol. 48, n.3, p.403–409, 2017.

BERWANGER, A.L.S.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F. & SCAMPARINI, A.R.P. *Production and rheological characterization of biopolymer of Sphingomonas capsulata ATCC 14666 using conventional and industrial media*. Applied biochemistry and biotechnology Vol. 129–132, p.942–50, 2006.

CHENG, Y.T. & YANG, C.F. *Using strain Rhodotorula mucilaginosa to produce carotenoids using food wastes*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers Vol. 61, p.270–275, 2016.

CIPOLATTI, E.; BULSING, B.; SÁ, C.S.; BURKERT, C.A.V.; FURLONG, E.B. & BURKERT, J.F.M. *Carotenoids from Phaffia rhodozyma: Antioxidant activity and stability of extracts*. African Journal of Biotechnology Vol. 14, n.23, p.1982–1988, 2015.

COLET, R.; URNAU, L.; BAMPI, J.; ZENI, J.; DIAS, B.B.; RODRIGUES, E.; JACQUES, R.A.; LUCCIA, M.D. & VALDUGA, E. *Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by Sporidiobolus salmonicolor*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Vol. 11, p.268–274, 2017.

DAVIES, B.H. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. In: GOODWIN, T. (Ed.). Carotenoids. London: Academic Press, p.38–165, 1976.

DESHMUKH, A.N.; GOKHALE, P.N. & JAIN, R. *Engineering of Bacillus subtilis for the Production of 2,3-Butanediol from Sugarcane Molasses*. Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 179, n.2, p.321–331, 2016.

EZEJIOFOR, T.; ENEBAKU, U.E. & OGUEKE, C. *Waste to Wealth-Value Recovery from Agro-food Processing Wastes Using Biotechnology: A Review*. British Biotechnology Journal Vol. 4, n.4, p.418–481, 2014.

FARIAS, F.O.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. & DEMIATE, I.M. *Mixture design applied to the study of bioethanol production from cheese whey and corn steep liquor*. Brazilian Journal of Food Research Vol. 7, n.3, p.150, 2016.

FEKETEA, G. & TSABOURI, S. *Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality?*. Food Chemistry Vol. 230, p.578–588, 2017.

FILLET, S.; GIBERT, J.; SUÁREZ, B.; LARA, A.; RONCHEL, C. & ADRIO, J.L. *Fatty alcohols production by oleaginous yeast*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Vol. 42, n.11, p.1463–1472, 2015.

FONSECA, R. & RAFAEL, R.D.S. *Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by Phaffia rhodozyma*. African Journal of Biotechnology, Vol. 10, n.7, p.1165–1171, 2011.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K. & GRIGROVA, D. *Formation of carotenoids by Rhodotorula glutinis in whey ultrafiltrate*. Biotechnology and bioengineering Vol. 44, n.8, p.888–94, 1994.

GAO, Y. & YUAN, Y.J. *Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto-L-gulonic acid fermentation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol. 59, n.18, p.9845–9853, 2011.

HAN, M.; DU, C.; XU, Z.Y.; QIAN, E. & ZHANG, W.G. *Rheological properties of phosphorylated exopolysaccharide produced by Sporidiobolus pararoseus JD-2*.

International Journal of Biological Macromolecules Vol. 88, p.603–613, 2016.

HOU, J. & CUI, H.L. *In vitro antioxidant, antihemolytic, and anticancer activity of the carotenoids from Halophilic archaea.* Current Microbiology Vol. 75, n.3, p.266–271, 2018.

KAUR, A.; GUPTA, V.; CHRISTOPHER, A.F.; MALIK, M.A. & BANSAL, P. *Nutraceuticals in prevention of cataract – An evidence based approach.* Saudi Journal of Ophthalmology Vol. 31, n.1, p.30–37, 2017.

KAYAHAN, E.; EROGLU, I. & KOKU, H.A. *Compact tubular photobioreactor for outdoor hydrogen production from molasses.* International Journal of Hydrogen Energy Vol. 42, n.4, p.2575–2582, 2017.

KONOPACKA, D.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A.; DYKI, B.; MACHLAŃSKA, A. & CELEJEWSKA, K. *The combined effect of ultrasound and enzymatic treatment on the nanostructure, carotenoid retention and sensory properties of ready-to-eat carrot chips.* LWT - Food Science and Technology Vol. 85, p.427–433, 2017.

KULCZYŃSKI, B.; MICHALOWSKA, A.G.; CISOWSKA, J.K. & KMIĘCIK, D. *The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge.* Journal of Functional Foods Vol. 38, p.45–65, 2017.

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 Vol. 20, n.10, p.929–934, 1998.

LOPES, N.A.; REMEDI, R.D.; SANTOS, S.C.; BURKERT, C.A.V. & BURKERT, J.F.M. *Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by Sporidiobolus pararoseus and Rhodothorula mucilaginosa.* Food Science and Biotechnology Vol. 26, n.3, p.759–766, 2017.

MACHADO, W. R. C. & BURKERT, J. F. M. *Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast Sporidiobolus pararoseus.* African Journal of Microbiology Research Vol. 9, n.4, p.209–219, 2015.

MANOWTTANA, A.; TECHAPUN, C.; WATANBE, M. & CHAIYASO, T. *Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast Sporidiobolus pararoseus KM281507 in an airlift bioreactor.* Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 125, n.1, p.59–66, 2018.

MARKETS e MARKETS. *Carotenoids Market by Type (Astaxanthin, Beta-Carotene, Canthaxanthin, Lutein, Lycopene, & Zeaxanthin), Source (Synthetic and Natural), Application (Supplements, Food, Feed, and Cosmetics), & by Region - Global Trends & Forecasts to 2021.* Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carotenoid-market-158421566.html>>. Acesso em: 24 out. 2018.

MICHELON, M.; MATOS, B.T.; SILVA, R.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 Vol. 21, n.1, p.1–8, 2012.

MISCHOPOULOU, M. NAIDIS, P.; KALAMARAS, S.; KOTSOPOULOS, T.A. & SAMARAS, P. *Effect of ultrasonic and ozonation pretreatment on methane production potential of raw molasses wastewater.* Renewable Energy Vol. 96, p.1078–1085, 2016.

NASCIMENTO, W.C.A.; SILVA, C.R.; CARVALHO, R.V. & MARTINS, M.L.L. *Optimization of a culture medium for protease production by Bacillus sp. thermophilic.*

Food Science and Technology Vol. 27, n.2, p.417–421, 2007.

NIU, F.X.; LU, Q.; BU, Y.F. & LIU, J.Z. *Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: Carotenoids and isoprenoid-based biofuels.* Synthetic and Systems Biotechnology Vol. 2, n.3, p.167–175, 2017.

PAN, N.C., PEREIRA, H.C.B., SILVA, M.L.C.; VASCONCELOS, A.F.D.; & CELLIGOI, M.A.P.C. *Improvement production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus in sugarcane molasses.* Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 182, n.1, p.276–293, 2017.

PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V. & VÁZQUEZ, M. *Optimization of carotenoid production by Phaffia rhodozyma cells grown on xylose.* Process Biochemistry Vol. 33, n.2, p.181–187, 1998.

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

ROOHBAKHSH, A.; KARIMI, G. & IRANSHAHI, M. *Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: A mechanistic review.* Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol. 91, p.31–42, 2017.

ROUKAS, T. *Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production.* Process Biochemistry Vol. 33, n.8, p. 805–810, 1998.

SARIOL, H.C.; YPERMAN, J.; SAUVANELL, A.B.; CARLEER, R.; CAMPA, J.N. & GRYGLEWICZ, G. *A novel acoustic approach for the characterization of granular activated carbons used in the rum production.* Ultrasonics Vol. 70, p.53–63, 2016.

SGUAREZI, C.M.; LONGO, C.; CENI, G.; BONI, G.; SILVA, M.F.; LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. & TREICHEL, H. *Inulinase production by agro-industrial residues: optimization of pretreatment of substrates and production medium.* Food and Bioprocess Technology Vol. 2, n.4, p.409–414, 2009.

SILVA, C.M.; BORBA, T.M.; KALIL, S.J. & BURKERT, J.F.M. *Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: Effect of the composition of culture medium and initial pH.* Food Technology and Biotechnology Vol. 54, n.4, p.489–496, 2016.

TASKIN, M.; ORTUCU, S.; AYDOGAN, M.N. & ARSLAND, N.P. *Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast Rhodotorula glutinis TR29.* Renewable Energy Vol. 99, p.198–204, 2016.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H. & LUCCIO, M. *Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides.* Química Nova Vol. 30, n.8, p.1860–1866, 2007.

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A. H., R.; CÊNCIA, K.; COLET, R.; TINGGEMANN, L.; ZENI, J. & TONIAZZO, G. *Carotenoids production from a newly isolated Sporidiobolus pararoseus strain using agroindustrial substrates.* Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Vol. 3, n.2, p.207–213, 2014.

VECINO, X.L.; PEREIRA, L.B; REY, R.D.; CRUZ, J.M. & MOLDES, A.B. *Optimization of liquid–liquid extraction of biosurfactants from corn steep liquor.*

Bioprocess and Biosystems Engineering Vol. 38, n.9, p.1629–1637, 2015.

WANG, D.; JU, X.; ZHOU, D. & WEI, G. *Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of Aureobasidium pullulans.*

Bioresource Technology Vol. 164, p.12–19, 2014a.

WANG, F.; HU, J.H.; GUO, C. & LIU, C.Z. *Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer.*

Bioresource Technology Vol. 166, p.602–605, 2014b.

XIA, W.; CHEN, W.; PENG, W. F. & LI, K. T. *Industrial vitamin B₁₂ production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates.* **Bioprocess and Biosystems Engineering** Vol. 38, n.6, p.1065–1073, 2015.

YOO, A.Y.; ALNAEELI, M. & PARK, J.K. *Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01.* **Process Biochemistry** Vol. 51, n.4, p.463–473, 2016.

YU, X.J.; YU, Z.Q.; LIU, Y. L.; SUN, J.; Zheng, J.Y. & WANG, Z. *Utilization of high-fructose corn syrup for biomass production containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated *Aurantiochytrium* sp. YLH70.* **Applied Biochemistry and Biotechnology** Vol. 177, n.6, p.1229–1240, 2015.

ZHENG, H.; MA, X.; GAO, Z.; WAN, Y.; MIN, M.; ZHOU, W.; LI, Y.; LIU, Y. HUANG, H.; CHEN, P. & RUAN, R. *Lipid production of heterotrophic *Chlorella* sp. from hydrolysate mixtures of lipid-extracted microalgal biomass residues and molasses.* **Applied Biochemistry and Biotechnology** Vol. 177, n.3, p.662–674, 2015.