

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 13/04/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

WHALLANS RAPHAEL COUTO MACHADO

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE
CAROTENOIDES MICROBIANOS**

São José do Rio Preto
2018

WHALLANS RAPHAEL COUTO MACHADO

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE
CAROTENOIDES MICROBIANOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora Capes

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ellen Silva Lago

Vanzela

São José do Rio Preto

2018

WHALLANS RAPHAEL COUTO MACHADO

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE
CAROTENOIDES MICROBIANOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto -SP
Orientador

Prof^a. Dr^a Márcia Luzia Rizzatto
IFSP – Matão – SP

Prof^a. Dr^a Ana Claudia Barana
UEPG - Ponta Grossa – PR

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto -SP

Prof. Dr. Maurício Bonatto Machado de Castilhos
UEMG – Frutal - MG

São José do Rio Preto – SP

13 de abril de 2018

Machado, Whallans Raphael Couto.

Bioprospecção de leveduras para produção de carotenoides microbianos / Whallans Raphael Couto Machado. -- São José do Rio Preto, 2018 123 f. : il., tabs.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Coorientador: Ellen Silva Lago Vanzela

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Leveduras (Fungos). 3. Carotenoides. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Ademar e Odavias**, pois sem eles não teria
chegado aonde cheguei.*

AGRADECIMENTOS

Aos **meus familiares**, pelo amor e apoio.

À Deus por estar presente diariamente em minha vida me dando forças para realizar este trabalho.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi**, por ter acreditado em mim, pela eficiência competente na orientação, além do conhecimento adquirido nesses quatro anos, também pela amizade e apoio necessários para que este trabalho pudesse ser realizado, muito obrigado professor.

Aos professores **Crispin Humberto Garcia Cruz, Ellen Silva Lago Vanzela e Ana Lúcia Barreto Penna** que contribuíram para o meu crescimento intelectual, na pós-graduação.

A **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Mauro** por várias vezes ter ido ao seu laboratório pedir o liofilizador.

Ao pessoal dos laboratórios de cereais e análise de alimentos por emprestar reagente e equipamentos, em especial **Tânia e Alana**.

À **Samara**, pela ajuda no decorrer deste curso, uma amiga para todas as horas, uma das pessoas que sempre irá fazer parte do meu círculo de amizade.

Aos amigos do laboratório pelos momentos de risadas, o que tornou o trabalho mais tranquilo.

À todos os meus colegas de sala, **Samara Murari, Guilherme Lorencini, Mariana Molina, Arturo Solis e Mariana Oliveira**, pela convivência, e pelos momentos divertidos ao longo do curso.

Ao aluno de iniciação científica, **Lucas Gomes da Silva**, pela ajuda no decorrer desse projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, por proporcionar condições para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos membros da banca, **Mauricio Bonatto, Marcia Luzia, Ana Claudia** e ao **João Claudio** que aceitaram gentilmente participar deste momento, e por suas sugestões que foram muito bem-vindas;

A todos que de uma certa maneira participaram desta conquista.

Termo agradecendo a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para o término deste trabalho. **MUITO OBRIGADO!**

Tenha coragem de seguir o que seu coração e sua intuição dizem. Eles já sabem o que você realmente deseja. Todo resto é secundário.

(Steve Jobs)

RESUMO

A bioprospecção é uma ferramenta valiosa, que possibilita a busca de novos micro-organismos com potencial biotecnológico. O Brasil apresenta vários biomas, dentre eles o Cerrado, com 2 milhões de quilômetros quadrados, ocupando 25% do território nacional, com uma estimativa de 70 a 100 mil espécies de fungos/leveduras. Entretanto, é pouco explorado em termos biotecnológicos. O objetivo desse trabalho, foi isolar e selecionar cepas de leveduras com capacidade de produção de carotenoides a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais (folhas, solo, flores, frutos silvestres e insetos) coletadas do bioma Cerrado, bem como outro espaço, do campus universitário da UNESP, localizando em São José do Rio Preto - SP. Foram encontrados 69 micro-organismos no bioma Cerrado que apresentaram coloração, com destaque para quatro leveduras, *Rhodotorula lactosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis* e *Rhodotorula aurantiaca*, e oito leveduras, para o bioma do campus universitário, com destaque para *Rhodotorula mucilaginosa*. Todas as cepas destacadas foram identificadas por análise de DNA (PCR). A produção microbiana de carotenoides foi influenciada pelas condições experimentais de cultivo submerso, tais como agitação (130 rpm a 230 rpm) e temperatura (25 °C a 35 °C). Para as leveduras isoladas *R. lactosa*, *R. glutinis*, *R. graminis* e *R. aurantiaca*, a melhor forma de cultivar foi a 130 rpm e 25 °C. Entretanto, existem outros fatores no cultivo submerso que devem ser considerados, como as componentes do meio de cultivo como o extrato de levedura (1 a 10 g/L), a peptona (1 a 10 g/L), a glicose (10 a 30 g/L), o extrato de malte (1 a 10 g/L) e o pH inicial (4,5 a 6,5), que apresentam influência na síntese de carotenoides, aumentando sua produção. Dentre os micro-organismos estudados (*R. lactosa*, *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*), a levedura *R. mucilaginosa* apresentou uma produção de carotenoides de 4164,45 µg/L (252,99 µg/g) com 16,46 g/L em biomassa. Na tentativa de substituição do agente de ruptura (DMSO – Dimetilsulfóxido) por outro método mais brando, o ácido acético com pérola de vidro apresentou uma extração de apenas 63,29 µg/g. Na batelada intermitente, é possível produzir quantidades semelhantes de carotenoides (2,8 mg/L) a cada 3 dias de cultivo, removendo 50% do meio. O uso de coproduto como substratos promoveu uma produção de carotenoides de 1829,81, 416,50 e 351,24 µg/L, respectivamente, com melaço (40 g/L), glicerol (10 g/L) e manipueira (40 g/L)

Palavras-chaves: Corantes microbianos, coprodutos, otimização

ABSTRACT

*Bioprospecting is now a valuable tool, enabling the search for new microorganisms with biotechnological potential. Brazil has several biomes, including the Cerrado, with 2 million square kilometers, occupying 25% of the national territory, with an estimated 70 to 100 thousand species of fungi/yeasts. However, it is little explored in biotechnology terms. The objective of this work was to isolate and select yeast strains with the capacity to produce carotenoids from the biodiversity present in environmental samples (leaves, soil, flowers, wild fruits and insects) collected from the Cerrado biome, as well as another space, the university campus of UNESP, located in São José do Rio Preto - SP. A total of 69 microorganisms were found in the Cerrado biome, with four yeasts, *Rhodotorula lactosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis* and *Rhodotorula aurantiaca*, and eight microorganisms, with emphasis on *Rhodotorula mucilaginosa*. All strains highlighted were identified by DNA analysis (PCR). The microbial production of carotenoids was influenced by the experimental conditions of cultivation, such as agitation (130 rpm at 230 rpm) and temperature (25 °C to 35 °C). For the isolated yeasts *R. lactosa*, *R. glutinis*, *R. graminis* and *R. aurantiaca*, the best way to cultivate was at 130 rpm and 25 °C. However, there are other factors in the submerged culture that must be considered, such as the components of the culture medium (yeast extract, peptone, glucose, malt extract and initial pH), which influence the synthesis of carotenoids, increasing their production. Among the studied microorganisms (*R. lactosa*, *R. glutinis* and *R. mucilaginosa*), yeast *R. mucilaginosa* presented a carotenoid production of 4164.45 µg/L (252.99 µg/g) with 16.46 g/L in biomass. In an attempt to substitute the DMSO with a milder method, the acetic acid with glass pearl presented an extraction of only 63.29 µg/g. In the intermittent batch, it is possible to produce similar quantities of carotenoids (2.8 mg/L) every 3 days of cultivation, removing 50% of the medium. The use of co-product as substrates promoted a carotenoid production of 1829.81, 416.50 and 351.24 µg/L respectively with molasses (40 g/L), glycerol (10 g/L) and cassava wastewater (40 g/L).*

Key-words: Microbial dyes, co-products, optimization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de alguns carotenoides	21
Figura 2: Micro-organismos isolados em cada fonte de obtenção	42
Figura 3: Classificação das leveduras pela coloração.	43
Figura 4: Curva de contorno para as respostas concentração volumétrica de carotenoides (a) e concentração específica de carotenoides (b) para a levedura <i>R. glutinis</i>	56
Figura 5: Curva de contorno para as respostas a concentração volumétrica de carotenoides (a) e a concentração específica de carotenoides (b) para a levedura <i>R. graminis</i>	59
Figura 6: Curva de contorno para as respostas crescimento celular (a) e concentração volumétrica de carotenoides (b) para a levedura <i>R. aurantiaca</i>	62
Figura 7: Curva de contorno para as respostas concentração volumétrica de carotenoides (a) e concentração específica de carotenoides (b) para a levedura <i>R. lactosa</i>	64
Figura 8: Curva de contorno para as respostas concentração volumétrica de carotenoides (a) e concentração específica de carotenoides (b) para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	67
Figura 9: Efeito das variáveis sobre a resposta de concentração volumétrica de carotenoides para o planejamento fatorial 2^{5-1} com 25 °C e 130 rpm para levedura <i>R. glutinis</i>	69
Figura 10: Efeito das variáveis sobre a resposta de carotenoides totais para o planejamento fatorial 2^{5-1} com 25 °C e 130 rpm para a levedura <i>R. lactosa</i>	72
Figura 11: Efeito das variáveis sobre a resposta de carotenoides totais para o planejamento fatorial 2^{5-1} com 25 °C e 130 rpm para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	74
Figura 12: Curva de contorno para a concentração volumétrica de carotenoides (a e b) em função de extrato de levedura, peptona e glicose, a 25 °C, 130 rpm por 144 h para a levedura <i>R. glutinis</i>	78
Figura 13: Curva de contorno para a concentração volumétrica (a e b) e concentração específica (c e d) de carotenoides em função de extrato de levedura, peptona e glicose sendo a 25 °C, 130 rpm por 144 h para a levedura <i>R. lactosa</i>	83
Figura 14: Curva de contorno para a concentração volumétrica (a e b) e concentração	

específica (c e d) de carotenoides em função de extrato de levedura, peptona e glicose sendo a 25 °C, 130 rpm por 144 h para a levedura <i>R. lactosa</i>	84
Figura 15: Curva de contorno para a concentração de carotenoides (a e b) em função do extrato de levedura, peptona e pH inicial em 25 °C,130 rpm por 144h para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	89
Figura 16: Cinética da produção de carotenoides totais por <i>Rhodotorula glutinis</i> na validação dos modelos empíricos utilizando o meio de cultivo <i>yeast malt</i>	91
Figura 17: Cinética da produção de carotenoides totais por <i>Rhodotorula lactosa</i> na validação dos modelos empíricos utilizando o meio de cultivo <i>yeast malt</i>	93
Figura 18: Cinética da produção de carotenoides totais por <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> na validação dos modelos empíricos utilizando o meio de cultivo <i>yeast malt</i>	95
Figura 19: Cinética da concentração de carotenoides por batelada intermitente pela <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> utilizando o meio de cultivo <i>yeast malt</i>	98
Figura 20: Cinética da comparação da concentração de carotenoides por batelada vs batelada intermitente pela <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> utilizando o meio de cultivo <i>yeast malt</i>	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição físico-química do glicerol bruto	32
Tabela 2: Composição físico-química da manipueira.....	33
Tabela 3: Valores utilizados no delineamento composto central (DCC) 2 ² com pontos centrais para verificar a influência dos fatores na bioprodução	37
Tabela 4: Valores utilizados no planejamento fatorial 2 ⁵⁻¹ com pontos centrais para verificar a influência dos fatores na bioprodução.....	37
Tabela 5: Concentrações dos coprodutos para produção de carotenoides	39
Tabela 6: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado. Pigmentação Alaranjada.....	44
Tabela 6 Continuação: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado. Pigmentação Alaranjada	45
Tabela 7: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado. Pigmentação Rósea	46
Tabela 7 Continuação: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado. Pigmentação Rósea	47
Tabela 8: Produção de carotenoides pelas micro-organismos isoladas do cerrado. Pigmentação Amarelada	47
Tabela 8 Continuação: Produção de carotenoides pelas micro-organismos isoladas do cerrado. Pigmentação Amarelada	48
Tabela 9: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do Campus Universitário	48
Tabela 10: Produção de carotenoides pelas principais leveduras isoladas	49
Tabela 11: Delineamento composto central 2 ² (valores reais e codificados) para maximização das condições de processo, agitação e temperatura.....	52
Tabela 11 Continuação: Delineamento composto central 2 ² (valores reais e codificados) para maximização das condições de processo, agitação e temperatura	53
Tabela 12: Produção de carotenoides em função da combinação de agitação e temperatura.....	54
Tabela 13: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica e específica de carotenoides para a levedura <i>R. glutinis</i>	55
Tabela 14: Análise de variância para o delineamento composto central 2 ² para a	

levedura <i>R. glutinis</i>	57
Tabela 15: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica e específica em carotenoides para a levedura <i>R. graminis</i>	57
Tabela 16: Análise de variância para o delineamento composto central 2^2 para a levedura <i>R. graminis</i>	58
Tabela 17: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica de carotenoides (CVC) e biomassa para a levedura <i>R. aurantiaca</i>	60
Tabela 18: Análise de variância para o delineamento composto central 2^2 para a levedura <i>R. aurantiaca</i>	60
Tabela 18 Continuação: Análise de variância para o delineamento composto central 2^2 para a levedura <i>R. aurantiaca</i>	61
Tabela 19: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica e específica de carotenoides para a levedura <i>R. lactosa</i>	63
Tabela 20: Análise de variância para o delineamento composto central 2^2 para a levedura <i>R. lactosa</i>	63
Tabela 21: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica e específica de carotenoides para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	65
Tabela 22: Análise de variância para o delineamento composto central 2^2 para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	66
Tabela 23: Planejamento fatorial 2^{5-1} (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para bioprodução de carotenoides para levedura <i>R. glutinis</i>	68
Tabela 24: Planejamento fatorial 2^{5-1} (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para bioprodução em carotenoides para a levedura <i>R. lactosa</i>	71
Tabela 25: Planejamento fatorial 2^{5-1} (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para bioprodução em carotenoides para a levedura <i>R. mucilaginoso</i> ...	73
Tabela 25 Continuação: Planejamento fatorial 2^{5-1} (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para bioprodução em carotenoides para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	74
Tabela 26: Delineamento composto central 2^3 (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura <i>R. glutinis</i>	76

Tabela 27: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica de carotenoides para a levedura <i>R. glutinis</i> .	77
Tabela 28: Análise de variância para o delineamento composto central 2^3 para a levedura <i>R. glutinis</i>	78
Tabela 29: Delineamento composto central 2^3 (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura <i>R. lactosa</i>	79
Tabela 29 Continuação: Delineamento composto central 2^3 (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura <i>R. lactosa</i>	80
Tabela 30: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica e específica de carotenoides para a levedura <i>R. lactosa</i>	81
Tabela 31: Análise de variância para o delineamento composto central 2^3 para a levedura <i>R. lactosa</i>	82
Tabela 32: Delineamento composto central 2^3 (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	85
Tabela 33: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica de carotenoides para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	86
Tabela 34: Análise de variância para o delineamento composto central 2^3 para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	88
Tabela 35: Resposta da validação do modelo matemático para a levedura <i>R. glutinis</i> ..	90
Tabela 36: Resposta da validação do modelo matemático para a levedura <i>R. lactosa</i> ..	92
Tabela 37: Resposta da validação do modelo matemático para a levedura <i>R. mucilaginoso</i>	94
Tabela 38: Produção de carotenoides desde o isolamento até a otimização	96
Tabela 38 Continuação: Produção de carotenoides desde o isolamento até a otimização	97
Tabela 39: Concentração específica de carotenoides, utilizando a combinação das técnicas de ultrassom, pérolas de vidro e ácido, na biomassa (<i>Rhodotorula mucilaginoso</i> URM 7409).....	100
Tabela 40: Produção de carotenoides por diferentes concentrações de coprodutos	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

YM	<i>Yeast malt</i>
GYMP	<i>Glucose, yeast malt and peptone</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Estrutura e classificação dos carotenoides.....	3
3.2. Importância dos carotenoides	4
3.3. Valor comercial dos carotenoides	5
3.4. Fatores que exercem influência sobre a produção dos carotenoides	6
3.4.1. <i>Efeito do pH inicial no meio</i>	6
3.4.2. <i>Efeito da taxa de aeração e agitação</i>	7
3.4.3. <i>Efeito da temperatura</i>	8
3.4.4. <i>Efeito da composição do meio de cultivo</i>	9
3.5. Prospecção e seleção de micro-organismos produtores de carotenoides	11
3.6. Coprodutos industriais.....	13
3.7. Glicerol	14
3.8. Manipueira.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Coleta de amostras.....	17
4.2. Isolamento das leveduras.....	18
4.2.1. <i>Manutenção da cepa</i>	18
4.3. Inóculo	18
4.4. Bioprodução de carotenoides.....	19
4.5. Identificação da levedura.....	19
4.6. Maximização das condições de processo para bioprodução de carotenoides	19

4.7. Maximização das condições de cultivo para bioprodução de carotenoides	20
4.8. Produção de carotenoides em batelada intermitente.....	21
4.9. Produção de carotenoides microbianos em fontes alternativas de nutrientes.....	21
4.10. Técnicas de ruptura celular.....	22
4.10.1. <i>Técnicas químicas de ruptura celular</i>	22
4.10.1.1. <i>Ácido clorídrico, acético e lático</i>	22
4.10.2. <i>Técnicas mecânicas de ruptura celular</i>	22
4.10.2.1. <i>Abrasão com pérolas de vidro</i>	22
4.10.2.2. <i>Banho ultrassônico</i>	22
4.11. Métodos analíticos	22
4.11.1. <i>Determinação da concentração de biomassa</i>	22
4.11.2. <i>Determinação do pH</i>	23
4.11.3. <i>Recuperação de carotenoides totais</i>	23
4.11.4. <i>Determinação de carotenoides totais</i>	23
4.11.5. <i>Determinação da concentração de açúcares redutores totais</i>	24
4.12. Análise estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Isolamento e seleção de micro-organismos carotenogênicos	24
5.2. Prospecção fermentativa para produção de carotenoides	26
5.3. Seleção e identificação das leveduras.....	31
5.4. Maximização das condições de processo por delineamento experimental.....	32
5.4.1. <i>Verificação dos modelos para as respostas produção de carotenoides</i> <i>(volumétrica e específica) e de biomassa para a levedura R. glutinis</i>	36
5.4.2. <i>Efeito da condição de processo sobre as respostas concentração de</i> <i>carotenoides (volumétrica e específica) e de biomassa para a levedura R. graminis</i>	39
5.4.3. <i>Efeito da condição de processo sobre as respostas concentração de</i> <i>carotenoides (volumétrica e específica) e biomassa para a levedura R. aurantiaca</i>	

.....	41
5.4.4. Verificação dos modelos para as respostas concentração de carotenoides (volumétrica e específica) para a levedura <i>R. lactosa</i>	44
5.4.5. Verificação dos modelos para as respostas concentração de carotenoides (volumétrica e específica) para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	47
5.5. Seleção de fatores que compõem o meio de cultivo.....	49
5.5.1. Planejamento fracionário 2^{5-1} : Seleção de fatores que compõem o meio de cultivo para levedura <i>R. glutinis</i>	49
5.5.2. Planejamento fracionário 2^{5-1} : Seleção de fatores que compõem o meio de cultivo para a levedura <i>R. lactosa</i>	52
5.5.3. Planejamento fracionário 2^{5-1} : Seleção de fatores que compõe o meio de cultivo para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	55
5.6. Planejamento fatorial completo 2^3	57
5.6.1 Planejamento fatorial completo 2^3 para a levedura <i>R. glutinis</i>	58
5.6.2. Planejamento fatorial completo 2^3 para a levedura <i>R. lactosa</i>	61
5.6.3. Planejamento fatorial completo 2^3 para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	66
5.7. Validação dos experimentos na condição ótima	72
5.7.1. Validação dos experimentos para a levedura <i>R. glutinis</i>	72
5.7.2. Validação dos experimentos para a levedura <i>R. lactosa</i>	74
5.7.3. Validação dos experimentos para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	76
5.8. Aumento da produção de carotenoides (resumo)	78
5.9. Produção de carotenoides em batelada intermitente.....	79
5.10. Extração em diferentes métodos de ruptura não tóxicos	81
5.11. Produção de carotenoides em coprodutos.....	83
6. CONCLUSÕES.....	84
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	85
ANEXO 1: Laudo da identificação e depósito do isolamento de leveduras do bioma	

Cerrado.....	95
APÊNDICE 1: Curva padrão de biomassa para levedura <i>R. glutinis</i>	96
APÊNDICE 2: Curva padrão de biomassa para levedura <i>R. graminis</i>	96
APÊNDICE 3: Curva padrão de biomassa para levedura <i>R. aurantiaca</i>	97
APÊNDICE 4: Curva padrão de biomassa para levedura <i>R. lactosa</i>	97
APÊNDICE 5: Curva padrão de biomassa para levedura <i>R. mucilaginosa</i>	98
APÊNDICE 6: Curva padrão de açúcar redutor	98
APÊNDICE 7: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura <i>R. glutinis</i>	99
APÊNDICE 8: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura <i>R. Graminis</i>	100
APÊNDICE 9: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura <i>R. aurantiaca</i>	100
APÊNDICE 10: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura <i>R. lactosa</i>	101
APÊNDICE 11: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	102
APÊNDICE 12: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para a otimização do meio de cultivo para a levedura <i>R. glutinis</i>	103
APÊNDICE 13: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para a otimização do meio de cultivo para a levedura <i>R. lactosa</i>	104
APÊNDICE 14: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para a otimização do meio de cultivo para a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	105

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são um grupo de corantes responsáveis pelas cores alaranjada e avermelhada, encontrados em flores, vegetais e micro-organismos. Estas biomoléculas são antioxidantes importantes e compostos bioativos valiosos, que compreendem mais de 600 tipos de estruturas já caracterizadas (UENOJO et al., 2007; TINOIA et al., 2005; FRASER e BRAMLEY, 2004).

Aproximadamente 80 carotenoides são sintetizados por bactérias fotossintéticas e por alguns fungos filamentosos, algas e leveduras (UENOJO et al., 2007). Os biocorantes podem ser obtidos por processos químicos (extração com solvente), a partir de plantas e de animais, ou por meio de síntese química com múltiplos estágios. Entretanto, esta opção não é muito viável para produzir a maioria dos carotenoides, devido à complexidade da estrutura química dos carotenos (REYES et al., 2014). Outra rota mais sustentável seria a produção biotecnológica através de micro-organismos, como os oleaginosos, que produzem/acumulam lipídeos no interior da célula. Dentre esta fração lipídica, estão os carotenoides.

Os micro-organismos carotenogênicos compreendem algas, leveduras, bolores e bactérias. Tais seres microscópicos crescem mais rápido que as culturas agrícolas, além do fato do seu cultivo não ser sazonal. Entre os micro-organismos oleaginosos, as leveduras apresentam algumas vantagens em relação às bactérias, aos bolores e às algas, como alta taxa de crescimento, de biomassa, de teor de lipídeo e de carotenoides. Além disso, não apresentam resistência a antibióticos como as bactérias. Estudos recentes apontam atividade antibactericida nos extratos de carotenoides, podendo ser aplicada em vários produtos alimentícios (YOO et al., 2016; DIAS et al., 2015; BRAUNWALD et al., 2013).

Existem muitos micro-organismos produtores de carotenoides, porém apenas alguns são biotecnologicamente interessantes. O isolamento e seleção de micro-organismos potenciais produtores de carotenoides como astaxantina, toruleno, β -criptoxantina, luteína e β -caroteno são descritos na literatura (VALDUGA et al., 2014; OTERO, 2011; CABRAL et al., 2011).

O Brasil tem um ecossistema diversificado e único que pode proporcionar leveduras com potencial biotecnológico para a produção de carotenoides, como o bioma Cerrado, uma savana tropical inexplorada com potencial para prospecção de leveduras para diversos seguimentos biotecnológicos (SPERANDIO et al., 2015; OTERO, 2011).

Os carotenoides microbianos têm demonstrando uma atividade antioxidante *in vitro* satisfatória (CIPOLATTI, 2015), podendo ser armazenados por um período mais longo (MATIOLI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003) e, conseqüentemente, são mais facilmente assimilados pelo organismo quando bem encapsulados.

Uma característica importante da produção de um bioproduto é a formulação de um meio de cultivo industrial promissor que utilize matéria-prima de custo inferior, tal como a manipueira, um subproduto obtido da prensagem da mandioca, a qual apresenta uma gama de micronutrientes (P, K, Mg e Zn). Segundo Sentanin (2011), o glicerol oriundo da produção de biodiesel também é rico em minerais como K, Na e P (SANTOS, 2010), fazendo desses dois coprodutos gerados no país um meio de cultivo promissor, satisfazendo as necessidades nutricionais da levedura do gênero *Rhodotorula*.

Nesse contexto, a proposta de trabalho foi selecionar leveduras que sejam carotenogênicas e, ao mesmo tempo, capazes de serem cultivadas em resíduos agroindustriais para essa produção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Isolar e selecionar cepas de leveduras silvestres produtoras de carotenoides a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais, coletadas do bioma Cerrado e no campus universitário.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo consistiram em:

- 1- Isolar leveduras presentes em amostras ambientais e mantê-las conservadas;
- 2- Selecionar dentre as leveduras isoladas as que apresentaram coloração característica de carotenos e maior bioprodução volumétrica em carotenoides, identificando-as quanto ao gênero e espécie;
- 3 - Estudar a influência das condições de processo (temperatura e agitação), através de um delineamento composto central rotacional 2²;
- 4 - Verificar a influência das concentrações de extrato de levedura, extrato de malte, peptona, sacarose e pH inicial do meio na bioprodução de carotenoides,

experimentos, foram analisados valores intermediários e a produção com 25 g/L (333,01 µg/L) apresenta melhor resultado, quando comparada com a produção com 40 g/L (241,07 µg/L). Dessa forma, a faixa de 5 a 20 g/L dessa fonte de carbono associada a outra fonte de nitrogênio pode incrementar a bioprodução de corantes.

Akus e Eren (2005) constataram que o melaço de beterraba apresenta melhor produção de corantes do que o soro de queijo e o óleo da semente de girassol. Além disso, a medida que se aumenta a concentração do melaço (2,5 para 20 g/L) a produção de carotenoides se eleva.

A facilidade de adaptação da levedura *R. mucilaginosa* ao melaço se deve a presença de açúcar não-redutor, a sacarose e outros componentes (metais inorgânicos, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos e gorduras brutas) que estimula a produção de biomassa e carotenoides, podendo superar o meio convencional YM (CHENG e YANG, 2016).

As fontes de carbono para produção de corantes são consideradas promissoras para bioprodução, bem como a faixa selecionada. Entretanto, as leveduras necessitam de uma fonte de nitrogênio para regular as necessidades metabólicas (multiplicação celular, rotas bioquímicas da síntese carotenogênicas). A manipueira é relatada como um coproduto promissor, pois apresenta quantidades mínimas de nitrogênio, além de uma gama de outros minerais, podendo estimular a síntese celular e de carotenoides (SENTANIN, 2011).

Ao analisar a Tabela 40, verifica-se que a faixa acima de 40 g/L de manipueira pode prejudicar a produção de carotenoides. Entretanto, quantias próximas a 40 g/L são favoráveis para a bioprodução. Dessa forma, selecionar a faixa de produção de 20 a 50 g/L na combinação de uma fonte de carbono pode beneficiar a bioprodução.

6. CONCLUSÕES

No bioma Cerrado, da região central do Brasil, com a prospecção de leveduras, foram isoladas 470 colônias, dentre elas 69 micro-organismos com potencial de produção de corantes, sendo que quatro apresentaram destaque para produção de carotenoides, a *Rhodotorula glutinis*, a *Rhodotorula graminis*, a *Rhodotorula aurantiaca* e a *Rhodotorula lactosa*.

No bioma universitário (UNESP) localizado na cidade de São José do Rio Preto – SP, foram isoladas 30 colônias, sendo que oito apresentaram pigmentação laranja e rósea, com destaque para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*

Foi possível otimizar três leveduras (*Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula lactosa* e *Rhodotorula mucilaginosa*) por planejamento 2³, e com destaque para a *Rhodotorula mucilaginosa* obtendo uma produção de carotenoides de 4164,45 µg/L (252,99 µg/g).

Foi constatado que a levedura *R. mucilaginosa* apresenta produção semelhante quando removido 50% do meio de cultivo, quando comparado ao processo simples (7 dias), podendo ser trabalhado um processo contínuo de renovação do meio.

No processo de ruptura por métodos não tóxicos, o método com ácido acético na combinação de pérola de vidro apresenta uma recuperação de 63,29 µg/g de carotenoides específicos.

Dentre as fontes de cultivo alternativos, o melaço de cana de açúcar mostrou-se promissor para produção de corantes para uma faixa de 40 a 50 g/L, na combinação de uma fonte de nitrogênio como a manipueira na faixa de 20 a 50 g/L.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros:

- Avaliar meios de cultura alternativos contendo substratos ricos em açúcares e proteínas, como o caldo da cana-de-açúcar e a manipueira.
- Cultivar em fermentador de bancada e avaliar parâmetros cinéticos da bioprodução.
- Produzir carotenoides em batelada intermitente, batelada alimentada e processo contínuo.

REFERÊNCIAS

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

AGEITOS, J. M. et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 90, n. 4, 1219–1227, maio, 2011.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, Netherlands, v. 35, n. 2, p. 107–113, jul., 2007.

ALIPOUR, S. et al. β -carotene production from soap stock by loofa-immobilized *Rhodotorula rubra* in an airlift photobioreactor. **Process Biochemistry**, Kidlington, v.

4, p. 9–19, mar., 2017.

AMORIM-CARRILHO, K. T. et al. Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, Kidlington, v. 56, p. 49–73, abr. 2014.

ARAUJO, M. A. M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do Cerrado.**, 67f. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia). Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS, 2015.

ARAYA-GARAY, J. M. et al. Construction of a novel *Pichia pastoris* strain for production of xanthophylls. **AMB Express**, Londres, v. 2, n. 1, p. 24, abr., 2012.

Association of Official Analytical Chemists – **AOAC.; Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**, 18th ed., AOAC International: Washington, 2000.

BARAHONA, S. et al. Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica. **Extremophiles**, Tóquio, v. 20, n. 4, p. 479–491, jul., 2016.

BERWANGER, A. L. S. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 96p. Dissertação (Engenharia de alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim – RS, 2005.

BHOSALE, P.; GADRE, R. V. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β -carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 349–353, nov., 2002.

BHOSALE, P.; GADRE, R. V. β -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutante. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 26, n. 6, p. 327–332, jun., 2001.

BRAUNWALD, T. et al. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodototrula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 97, n. 14, p. 6581–6588, jul., 2013.

CABRAL, M. M. S. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **European Food Research and Technology**, Nova York, v. 233, p. 159–166, jul., 2011.

CARRILHO, K. T A. et al. Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, Kidlington, v. 5, p. 49–73, Apr., 2014.

- CHANDI, G. K. et al. Optimization of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis*. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 4, p. 881–887, ago. 2010.
- CHANG, CHIN-FENG et al. Diversity of yeasts associated with the sea surface microlayer and underlying water along the northern coast of Taiwan. **Research in Microbiology**, Paris, v. 167, n. 1, p. 35–45, jan., 2016.
- CHEIRSILP, B. et al. Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 362–368, jul., 2011.
- CHENG, YU-TING; YANG, CHU-FANG. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Amsterdam, v. 61, p. 270–275, abr., 2016.
- CIPOLATTI, E. et al. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 14, p. 1982–1988, jun., 2015.
- COELHO, A. R. Evaluation of potential antagonism in yeasts, seeking biocontrol of spoilage by *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 32, n. 1, p. 1879–1892, out., 2011.
- CUTZU, R. et al. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 29, n. 6, p. 1009–1017. jun., 2013.
- DAVIES, B. H. *Chemical Biochemistry Plant Pigments*; GOODWIN, T.W., ed.; **Academic Press**: Nova York, 1976.
- DIAS, C. et al. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 189, p. 309–318, abr., 2015.
- EL-BANNA, A. A. et al. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**, Bolonha, v. 3, p. 64–71, out., 2012.
- FAI, A. E. C. et al. Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma*

tsukubaensis using cassava wastewater and consecutive production of galacto-oligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Illinois, v. 4, n. 4, p. 535–542, out., 2015.

FONSECA, R. A. S. et al. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 10, n. 7, p. 1165–1171, fev., 2011.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**. Kidlington, v. 43, n. 3, p. 228–265, maio, 2004.

FRENGOVA, G. et al. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 44, p. 888–894, out. 1994.

GARDA, J. et al. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, Kidlington, v. 16, p. 423–428, jun., 2005.

HEMMERLIN, A. et al. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? **Progress in Lipid Research**, Kidlington, v. 51, p. 95–148, abr., 2012.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 5 p. 64–72, mar., 2014.

INTANOO, P. et al. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 173, p. 256–265, dez., 2014.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 70, p. 102–110, dez., 2013.

KARAMEROU, E. E. et al. A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. **Biomass and Bioenergy**, Kidlington, v. 69, p. 113–122, jun., 2016.

KIM, S. G. et al. Determination of optimum fermentation conditions for carotenoid production by *Rhodotorula aurantiaca* K-505. **Korean Journal of Chemical Engineering**, New York, v. 28, n. 1, p. 216–220, jan., 2011.

KONG, P. S. et al. Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 63, p. 533–555, set., 2016.

KOT, A. M. et al. Biodegradation of deproteinized potato wastewater and glycerol during cultivation of *Rhodotorula glutinis* yeast. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 18, n. 6, p. 428–432, nov., 2015.

KUSDIYANTINI, E. et al. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* o glycerol as a carbon source durin batch fermentation. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 20, n. 10, p. 929–934, out., 1998.

LATHA, B. V. et al. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. **Indian Journal of Biotechnology**, Nova Deli, v. 4, p. 353–357, jul., 2005.

LIBKIND, D.; BROOCK, M. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 22, p. 687–692, jul., 2006.

LOPES, N. A. et al. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 26, n. 3, p. 759–766, jun., 2017.

LUO, H. et al. A pH control strategy for increased β -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast. **Process Biochemistry**, Kidlington, v. 48, p. 195–200, 2013.

MACHADO, J. R. et al. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 54, p. 17–21, mar., 2014.

MACHADO, W. R. C. **Otimização da produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais**. 103f. Dissertação (Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2013.

MACHADO, W. R. C.; BURKET, J. F. M. Optimization of agroindustrial médium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 9, n. 4, p. 209–219, jan., 2015.

- MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 9, n. 7, p. 2281–2287, maio, 2008.
- MARTIN, A. M. et al. Growth Parameters for the Yeast *Rhodotorula rubra* Grown in Peat Extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 76, n. 4, p. 321–325, ago., 1993.
- MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulation of lycopene with cyclodextrins. **Food Science and Technology**, Campinas v. 23, p. 102–105, dez., 2003.
- MEDEIROS, F. O. et al. Ultrasonic waves and glass pearls: a new method of extraction of β -galactosidase for use in laboratory. **Química nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, 336–339, set., 2008.
- MICHELON, M. et al. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, Seoul v. 21, p. 1–8, fev., 2012.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar., 1959.
- MORAIS, F. L., **Carotenoides: Características biológicas químicas**. 70f. Monografia (Qualidade em Alimentos), Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo (CET), Brasília – DF, 2006.
- MOREIRA, G. A. M. et al. Leveduras associadas a frutos de plantas nativas do Cerrado: *Eugenia lutescens* Cambess, *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg e *Brosimum guadichaudii* Tréc. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 12, n. 2, p. 104–111, ago., 2015.
- MULITERNO, A. et al. Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 66, p. 1132–1138, nov./dez. 2005.
- NAZIRI, E. et al. Valorization of the major agrifood industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications. **Food Research International**, Amsterdam, v. 65, p. 350–358, nov., 2014.
- NI, H. et al. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, Hangzhou, v. 9, n. 1, p. 51–59, jan., 2008.

OBULESU, M. et al. Carotenoids and Alzheimer's Disease: An insight into therapeutic role of retinoids in animal models. **Neurochemistry International**, Kidlington v. 59, n. 5, p. 535–541, out., 2011.

ORTUCU, S. et al. Evaluation of Waste Loquat Kernels as Substrate for Lipid Production by *Rhodotorula glutinis* SO28. **Waste and Biomass Valorization**, Netherlands, v. 8, n. 3, p. 803–810, abr., 2017.

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

PARK, P. K. et al. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 21, n. 4, p. 429–434, jun., 2005.

PEREIRA, G. V.M. et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 188, p. 60–66, out., 2014.

PETRIK, S. et al. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 90, p. 307–315, set., 2014.

PETRIK, S. et al. Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. **Annals of Microbiology**, Nova York, v. 63, n. 4, p. 1537–1551, dez., 2013.

QUISPE, C. A. G. et al. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 27, p. 475–493, jun., 2013.

REYES, L. H. et al. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. **Metabolic Engineering**, San Diego, v. 21, p. 26-33, jan., 2014.

RIBEIRO, S. C. et al. Above- and belowground biomass in a Brazilian Cerrado. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 262, n. 3, p. 491–499, ago., 2011.

ROSA, P. R. F. et al. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing

- wastewater. **Chemical Engineering Journal**, Lausana, v. 284, p. 1–9, jan. 2016.
- SAENGE, C. et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, Kidlington, v. 46, n. 1, 210–218, jan., 2011.
- SAMPAIO, J. P. Utilization of Low Molecular Weight Lignin-Related Aromatic Compounds for the Selective Isolation of Yeasts: *Rhodotorula vanillica*, a New Basidiomycetous Yeast Species. **Systematic and Applied Microbiology**, Estugarda, v. 17, p. 613–619, fev., 1994.
- SANTOS, D. T. et al. Production of stabilized sub-micrometric particles of carotenoids using supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 61, p. 167–174, jan., 2012.
- SCHNEIDER, T. et al. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, Kidlington, v. 61, p. 34–43, nov., 2013.
- SCHWENGBER, C. A. et al. Overview of glycerol reforming for hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 58, p. 259–266, maio, 2016.
- SENTANIN, M. A. **Obtenção e propriedades de toruleno da levedura *Rhodotorula glutinis***. 156f. Tese (Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp, CAMPINAS – SP, 2011.
- SHICHANG, L. et al. Screening of lipid high producing mutant from *Rhodotorula glutinis* by low ion implantation and study on optimization of fermentation medium. **Indian Journal of Microbiology**, Nova York, v. 53, n. 3, p. 343–351, set., 2013.
- SILVA, D. S. P. et al. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Kidlington, v. 97, p. 85–89, jan./fev., 2015.
- SIVA, R. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. **Current Science**, Bangalore, v. 92, n. 7, p. 1–9, abr., 2007.
- SPERANDIO, E. M. et al. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. **Fungal Biology**, Kidlington, v. 119, n. 11, p. 984–993, nov., 2015.

SPIERO, F. et al. Bioconversion of Raw Glycerol Generated from the Synthesis of Biodiesel by Different Oleaginous Yeasts: Lipid Content and Fatty Acid Profile of Biomass. **Indian Journal of Microbiology**, Nova York, v. 55, p. 415–422, dez., 2015.

TAHERZADEH, M. J. et al. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol a review. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v. 31, n. 1–2, p. 53–66, jul, 2002.

TASKIN, M. et al. Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. **Renewable Energy**, Kidlington, v. 99, p. 198–204, dez., 2016.

TINOIA, J. et al. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, Kidlington, v. 40, n. 7, p. 2551–2557, jun., 2005.

TURCSI, E. et al. Study on the elution order of carotenoids on endcapped C₁₈ and C₃₀ reverse silica stationary phases. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 47, p. 101–112, abr., 2016.

UENOJO, M. et al. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 616–622, maio/jun. 2007.

VALDUGA, E. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Illinois, v. 3, n. 2, p. 207–213, abr., 2014.

VALDUGA, E. et al. Evaluation of aeration and substrate concentration on the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in bioreactor. **European Food Research and Technology**, Nova York, v. 232, n. 3, p. 453–462, mar., 2011.

VALDUGA, E. et al. Pré tratamento de melaço de cana de açúcar e água de maceração para a bioprodução de carotenoides. **Química Nova**, São Paulo v. 30, n. 8, p. 1860–1866, abr., 2007.

VALDUGA, E. et al. Pretreatment of sugarcane molasses and corn steep liquor for the production of carotenoids. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1860–1866, abr., 2007.

- VENIL, C. K. et al. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochem**, Kidlington, v. 48, n. 7, p. 1065–1079, jul., 2013.
- VICKERS, C. et al. Recent advances in synthetic biology for engineering isoprenoid production in yeast. *Current Opinion in Chemical Biology*, Kidlington, v. 40, p. 47–56, out., 2017.
- YANG, SHI-PING et al. Distribution of Marine Red Yeasts in Shrimps and the Environments of Shrimp Culture. **Current Microbiology**, Nova York, v. 62, n. 5, p. 1638–1642, maio, 2011.
- YEN, HONG-WEI et al. The effects of feeding criteria on the growth of oleaginous yeast – *Rhodotorula glutinis* in a pilot-scale airlift bioreactor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Amsterdam, v. 49, p. 67–71, 2015.
- YOO, J. et al. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 463–473, abr., 2016.
- ZHAO, X. et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Nova Jersey, v. 110, n. 5, p. 405–412, maio, 2008.