



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,

realizando planejamento experimental;

5 - Comparar a batelada com a batelada intermitente de cultivo;

6 – Extrair carotenoides por processos químicos (ácidos orgânicos) e físicos (pérola de vidro e banho ultrassom);

7- Testar, com a cepa mais promissora, subprodutos industriais, como o melão de cana de açúcar, glicerol e a manipueira, como meio de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

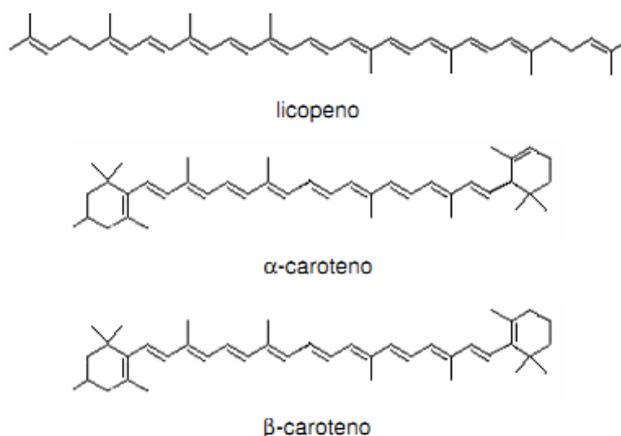
3.1. Estrutura e classificação dos carotenoides

Os carotenoides são tetraterpenoides, derivados de isopreno (unidade estrutural chave), construídos a partir de oito unidades de isopreno, com um sistema extenso de duplas ligações conjugadas, responsáveis por suas propriedades e funções, que geralmente contêm 40 átomos de carbono (UENOJO et al., 2007). Podem apresentar isomeria interna e normalmente apresentam uma ou duas estruturas cíclicas nas extremidades das cadeias.

São grupos de compostos que compreendem mais de 50.000 estruturas diferentes, devido a modificações que a estrutura base pode sofrer, como ciclização, rearranjo, isomerização, introdução de grupos contendo oxigênio ou a combinação destes processos resultando numa imensa variedade de estruturas (TURCSI et al., 2016).

Os isoprenos exibem cores como amarelo, laranja ou vermelho, devido ao sistema de dupla ligações que constituem o grupo cromóforo responsável pela sua cor. Quanto maior o número de ligações conjugadas, maior será a banda de absorção em maiores comprimentos de onda, resultando em carotenoides mais avermelhados (VICKERS et al., 2017).

Os carotenoides podem ser classificados em dois grandes grupos: (1) carotenos, formados a partir de átomos de carbono e hidrogênio em sua estrutura (hidrocarbonetos puros); (2) xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados, atuando como grupo hidroxilo e/ou substituindo pares de hidrogênio - ponte de epóxido (ARAYA-GARAY et al., 2012)

Figura 1: Estrutura química de alguns carotenoides

Fonte: Nascimento (2006).

Por outro lado, os vários tipos de carotenoides bem como seus isômeros geométricos podem expressar algumas propriedades únicas, causando impacto em sua solubilidade, estabilidade, absorção, metabolismo e nas suas possíveis ações biológicas (CARRILHO et al., 2014)

3.2. Importância dos carotenoides

Os carotenoides apresentam funções fisiológicas distintas: em plantas, atuam no processo de fotossíntese e fototaxia (movimento dos seres vivos em reação a estímulos luminosos); para os seres humanos, atuam como poderoso antioxidante, impedindo a formação de radicais peroxil (oxigênio molecular singleto) nas membranas celulares ou tecidos. Esta capacidade está relacionada à sua estrutura química, que apresenta ligações duplas alternadas em sua cadeia (JOMOVA e VALKO, 2013). Por exemplo, o licopeno tem mais poder antioxidante que o β -caroteno por apresentar onze ligações duplas conjugadas, contra nove duplas ligações conjugadas do β -caroteno.

Os carotenoides são capazes de sequestrar as espécies reativas de oxigênio, como peróxidos de hidrogênio que apresentam elétrons desemparelhados em sua última órbita. Esta capacidade de oxidação está relacionada com a estabilização do radical livre por ressonância (movimentação do elétron) na cadeia acíclica dos carotenoides. Dessa forma, quanto mais extensa for a cadeia, maior é a quantidade de elétrons suportados (UENOJO et al., 2007).

Uma vez que o efeito potencial contra os processos de estresse oxidativo que os carotenoides conferem está associado à sua estrutura química, as biomoléculas podem

ser ordenadas da seguinte forma crescente: licopeno, astaxantina ou cantaxantina, β -caroteno ou bixina, luteína e crocina (MORAES, 2006). Entretanto, estes efeitos podem ser observados em uma dieta variada de vegetais e frutas na presença desses pigmentos.

Alguns estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo de carotenos (licopeno, astaxantina e β -caroteno) em uma dieta está associado à menor chance de doenças cardíacas e vasculares, degeneração muscular relacionada à idade, formação de catarata e doenças neurodegenerativas (AMORIM-CARRILHO et al., 2014). Além disso, os carotenoides também fortalecem o sistema imunológico. Por outro lado, uma deficiência desses isoprenoides na alimentação pode provocar doenças oculares graves como cegueira noturna e danos da córnea.

Diante do exposto, está claro que os carotenoides não são apenas corantes naturais, mas também potentes antioxidantes e, assim, compostos de alto valor agregado para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar (VENIL et al., 2013).

3.3. Valor comercial dos carotenoides

O ser humano sempre foi fascinado por cores. O uso de corantes e tingimento é tão antigo como a arte têxtil. Há relatos na China, datados desde 2600 a.C., sobre o uso primitivo de plantas ou frutas para tingir tecidos (SIVA, 2007). Com o avanço da civilização, a arte de colorir foi-se difundindo pelo mundo e avançando.

A partir da revolução industrial, em meados do século XIX, quando surgiu a produção em série de alimentos e produtos manufaturados, apesar de seus efeitos nocivos ao ser humano, animais e ao ambiente, os corantes sintéticos substituíram os corantes naturais, por serem mais baratos (VENIL et al., 2013).

Nas últimas décadas, com o avanço da ciência, percebeu-se uma série de relatos do uso de corantes sintéticos e seus efeitos com potencial alergênico e cancerígeno. Isso resultou numa mudança no comportamento dos consumidores, que passaram a exigir alimentos com propriedades funcionais e ausência de aditivos sintéticos (ABEROUMAND, 2011).

A demanda do mercado global de carotenoides para o ano de 2017 foi estimada em 10 bilhões de toneladas, com uma taxa de crescimento anual de 2,9%, a partir de 2013 (VENIL et al., 2013). O mercado tem projetado uma estimativa de 643 milhões de dólares para os três carotenoides: zeaxantina, luteína e β -caroteno (NAZIRI et al., 2014). No entanto, a maior parte desses pigmentos é derivada da síntese química, não

satisfazendo o desejo dos consumidores por corantes naturais.

Assim, os aspectos negativos do uso de carotenoides obtidos pela síntese química vêm aumentando o interesse na obtenção de biocorantes por processos biotecnológicos utilizando diferentes leveduras (MACHADO e BURKERT, 2015; MICHELON et al., 2012; SILVA et al., 2012; CIPOLATTI, 2012; FONSECA et al., 2011; OTERO, 2011; SILVA, 2010; SILVA, 2009).

Com alguns desafios superados inicialmente, hoje a indústria é capaz de produzir alguns corantes microbianos para aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e têxteis. A extração de biocorantes em formas relativamente puras e concentradas é o principal desafio tecnológico. A otimização de processos de fermentação e meios de cultivo são relatados como principais estratégias para a recuperação econômica de carotenoides (VALDUGA et al., 2014; MACHADO e BURKERT, 2015).

3.4. Fatores que exercem influência sobre a produção dos carotenoides

O cultivo de levedura como, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium* e em especial do gênero *Rhodotorula* pode ser afetado, durante a fermentação, por parâmetros físicos ou nutricionais, tais como a natureza da fonte de carbono e nitrogênio, sais minerais, pH, agitação e temperatura, em resposta ao crescimento celular e à produção do carotenoide (HERNÁNDEZ-ALMANZ et al., 2014). Vários estudos têm sido realizados para aperfeiçoar estes parâmetros de cultivos a fim de reduzir custos e melhorar o rendimento do bioproduto.

3.4.1. Efeito do pH inicial no meio

O pH também é um fator determinante no acúmulo de caroteno no interior da célula de levedura. Cheng e Yang (2016) verificaram que, na faixa entre 4 a 7 de pH estudada para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em meio YM, a concentração mais elevada de carotenoides (317,6 µg/g) foi com pH inicial 5, e que valores como 4 podem diminuir a concentração de biomassa e caroteno e pH acima de 6,5 não apresenta bons resultados. Latha et al. (2005) observaram que o melhor pH foi 5,5 para a levedura *Rhodotorula glutinis* em meio comercial Czapek Dox para bioprodução em carotenoides obtendo 3,5 mg/L.

Malisorn e Suntormsuk (2008) verificaram, na otimização com meio formulado

com salmoura de rabanete fermentado, utilizando a levedura *R. glutinis*, que entre pH de 4 a 8, o ideal inicial para o cultivo foi 6, resultando em uma produção de aproximadamente 210 µg/g em carotenoides, sendo 15% maior que as condições iniciais de processo.

O valor de pH do meio de cultivo não influenciou somente a atividade biosintética da levedura *R. glutinis* em estudo realizado por Taskin et al. (2016), mas também em meio formulado com melaço de beterraba e sulfato de amônia: o crescimento celular (14,5 g/L) e o teor de lipídeos (7,8 g/L) acumulado pela levedura aumentou até pH entre 5,0-5,5. Acima desses valores, ocorreu uma diminuição ou inibição da produção.

No cultivo misto com *Rhodotorula glutinis* e *Chorella vulgaris*, em meio formulado com efluente de peixe cozido e melaço de cana de açúcar, foi verificado que na variação de pH inicial de 5 a 8, a melhor condição para um bom desenvolvimento foi com pH 5 obtendo-se 4,63 g/L de biomassa e 2,88 g/L de lipídeo. À medida que o pH inicial era aumentado, ocorreu uma diminuição da quantidade de levedura, enquanto da microalga permanecia constante (CHEIRSILP et al., 2011).

Percebe-se que, para o gênero de levedura *Rhodotorula*, o pH ótimo de crescimento e produção em carotenoides está entre uma faixa de 5,0 a 5,5, dependendo da cepa utilizada. Entretanto, outros parâmetros devem ser considerados para uma eficiência na produção.

3.4.2. Efeito da taxa de aeração e agitação

O gênero *Rhodotorula* necessita de um processo que incorpore oxigênio no meio de cultivo para estimular o desenvolvimento da cultura, seja por aeração ou agitação, visto que se trata de um micro-organismo aeróbio (AKSU e EREN, 2007).

Saenge et al. (2011) observaram em um processo de otimização que a variação da vazão de ar de 0 a 2 vvm pode influenciar na produção de biomassa (8,17 g/L) e lipídeo (4,32 g/L) e que valores superiores a 3 vvm não apresentam ganhos em crescimento celular ou em lipídeo para a levedura *R. glutinis* em meio formulado somente com glicerol bruto (50% de pureza).

Os efeitos das condições físicas, como agitação, foram investigados por Cheirsilp et al. (2011), com uma cultura mista de *R. glutinis* e *Chlorella vulgaris*, em meio formulado com efluente de peixe cozido e melaço de cana de açúcar, onde

verificou-se que, em uma agitação entre 140 e 100 rpm, ocorreu uma diminuição de produção. Entretanto, um pequeno aumento foi observado quando a agitação foi aumentada de 140 rpm para 200 rpm, obtendo 4,5 g/L biomassa com 2,75 g/L de lipídeo em cinco dias de cultivo.

Martin et al. (1993) avaliaram que os parâmetros de crescimento, para a levedura *R. rubra* em meio formulado com extrato de turfa, agitação de 200 rpm, pH 5,5 e temperatura de 22 °C, favorecem o desenvolvimento do crescimento celular (4,58 g/L) e acúmulo em carotenoide (1.256 µg/g em β-caroteno), obtendo 70% de rendimento em biomassa, com 32% a mais em carotenoides quando comparado com as condições iniciais (pH inicial 4, agitação de 150 rpm e temperatura de crescimento de 20 °C).

Aksu e Eren (2007) isolaram uma levedura, *R. glutinis*, de água residuárias de uma empresa petrolífera, e verificaram que, na variação de aeração de 0 a 2,4 vvm, a melhor taxa foi com 2,4 vvm, obtendo 105,8 mg/L de carotenoides e 7,1 g/L de biomassa, sendo o dobro em produção de carotenoides quando comparado com o processo anaeróbio, no meio de cultivo formulado com YM modificado.

Para leveduras facultativas, o uso da aeração de ar no meio de cultivo estimula a produção de biomassa e carotenoides e é dita como um parâmetro essencial em cultivos com fermentadores, quando comparados aos cultivos em frascos agitados (ALIPOUR et al., 2017).

Segundo Yen et al. (2015), observou-se que a levedura *R. glutinis* cultivada em meio formulado com glicerol bruto e extrato de levedura, 1 vvm a 24 °C e pH inicial 5,5 apresentou 24 g/L de biomassa e um teor em lipídeos de 0,555 g/g e 0,582 mg/g em β-caroteno, valores maiores do que obtidos no meio em frascos agitados a 300 rpm.

A agitação das culturas determina a concentração de oxigênio no meio, podendo beneficiar o crescimento e desempenho de células microbianas, melhorando as características de rendimento e produção de carotenoides. Verifica-se que as leveduras do gênero *Rhodotorula* são aeróbias, necessitando de uma agitação de 140 a 200 rpm, ou, quando trabalhando em fermentador, de uma aeração de 2,0 a 2,4 vvm, podendo conseguir ganhos significativos em termos de biomassa e carotenoides.

3.4.3. Efeito da temperatura

Os carotenoides sintetizados pelas leveduras podem sofrer alterações em relação ao tipo, rendimento e concentração, dependendo tanto da espécie, da constituição

nutricional do meio e de alguns fatores ambientais como temperatura.

El-Banna et al. (2012) isolaram a levedura *R. glutinis* de uma flor (*Scabiosa atropurpurea*) e em seu estudo de variação de temperatura (5 °C a 30 °C), observaram que a temperatura de 25 °C proporciona melhor condição para alcançar 8,35 g/L de biomassa com 1,70 µg/L (204 µg/g) em carotenoides, em meio basal (BM) com glicose (25 g/L). Além disso, temperaturas superiores ou inferiores podem causar a perda parcial desse caroteno. Observou-se que a temperatura de 15 °C estimulou a produção de 55% de Toruleno, enquanto que a 30 °C obteve-se uma proporção de 60% em β-caroteno.

Bhosale e Gadre (2002) investigaram a produção e crescimento celular da *R. glutinis* mutante em meio YM modificado em diferentes condições de temperatura e iluminação. A temperatura ótima para o crescimento foi de 20 °C obtendo 250 mg/L com 90% de teor em β-caroteno. A iluminação não mostrou nenhum efeito com a temperatura de 20 °C, somente com 30 °C, ocorrendo uma diminuição do caroteno de 125 mg/L para 83 mg/L, dificultando o acúmulo de carotenoides na célula da levedura.

Em meio formulado com melão de beterraba, a levedura *R. glutinis*, isolada de solo contaminado com efluente de açúcar, apresentou ligeiro aumento em sua produção quando trabalhada à temperatura de 25 °C, obtendo 14,8 g/L em lipídeo e 7,9 g/L em biomassa. Mas, entre uma faixa de 20 °C a 35 °C, não ocorreu uma diferença significativa. Entretanto, temperaturas abaixo de 20 °C podem causar uma diminuição no metabolismo, que leva a um menor acúmulo em lipídeo e crescimento celular (TASKIN et al., 2016).

A temperatura pode ser considerada uns dos fatores mais relevantes em um processo fermentativo. Ela influencia não só o crescimento celular da levedura como também pode causar alterações em muitas vias de biossíntese, exercendo controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides como a fitoeno-desaturase, hidroxilase e licopeno-ciclase β-caroteno. Mudanças na concentração dessas enzimas podem exercer uma influência no nível de carotenoides nos micro-organismos (MALISORN e SUNTORNSUK, 2008; FRENGOVA et al., 1994).

3.4.4. Efeito da composição do meio de cultivo

Alguns estimulantes no meio de cultivo aliados ao ajuste nas condições de processo podem favorecer a produção microbiana de carotenoides. Embora o acúmulo

de carotenoides no interior da célula não esteja diretamente associado ao seu crescimento celular, percebe-se que algumas condições podem favorecer o gênero *Rhodotorula*, como, por exemplo, a variação de temperatura, do pH inicial e da agitação. O mesmo acontece em fermentador com a taxa de aeração, o que pode propiciar condições favoráveis para a formação do bioproduto desejado.

Por outro lado, alguns suplementos adicionados ao meio de cultivo podem beneficiar ainda mais a produção de carotenoides. O efeito de traços de metais como Mg^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} ou sais inorgânicos podem melhorar a atuação da enzima carotenogênica nas leveduras vermelhas, explicando, possivelmente, sua inibição ou ativação com determinados íons metálicos (AGEITOS et al., 2011; ZHAO et al., 2008).

Algumas fontes de nitrogênio podem influenciar na quantidade de carotenoides produzidos pelas leveduras. Bhosale e Gadre (2001), ao utilizar somente melaço de cana de açúcar com a levedura *R. glutinis*, obtiveram 14 mg/L (3,1 mg/g) em carotenoide, com teor em β -caroteno de 70%. No entanto, adicionando extrato de levedura, alcançaram 42,6 mg/L (3,4 mg/g) em carotenoides com 79 % em β -caroteno.

Já Park et al. (2005) realizaram estudo de otimização do meio basal (açúcares redutores, ureia, KH_2PO_4 e NaCl) com a levedura *R. glutinis*. O KH_2PO_4 teve influência significativa sobre a produção da biomassa (11,7 g/L) e de carotenoides (3,46 mg/L), resultando em um aumento de 1,9 vezes na biomassa e 2,5 vezes a concentração em caroteno, quando comparado ao meio não otimizado.

Cheng e Yang (2016) constataram que o uso de íons metálicos pode incrementar a bioprodução de carotenoides. A adição de três diferentes sais ($CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) na concentração 0,1 g/L no meio YM causou melhora de até 37,6% na obtenção de caroteno (3493,8 $\mu g/L$), quando comparado ao meio controle sem adição de sais.

Por meio de um planejamento experimental com variação da composição do meio YM, do pH inicial e da temperatura, pode-se obter condições ótimas de produção de carotenoides. Kim et al. (2011) observaram que o crescimento celular e a bioprodução de caroteno não apresentou uma relação direta para a levedura *Rhodotorula aurantiaca*, isolada de amostra de terra, alcançando a máxima produção em termos de carotenoide específico de 468 $\mu g/g$ com glicose (10 g/L), extrato de levedura (6 g/L), peptona (6 g/L) e sulfato de amônia (1,5 g/L) com pH inicial de 7 e temperatura de 20 °C, obtendo a máxima também em biomassa (14,2 g/L) e em concentração volumétricos de carotenoides (4,9 mg/L) em diferentes condições.

A capacidade de crescimento da levedura em várias fontes de carbono, tais como melão (cana ou beterraba), extrato de turfa e glicerol bruto, é uma vantagem notável, em especial sobre as *Rhodotorulas*. Assim, o gênero *Rhodotorula* pode ser um dos micro-organismos promissores para a produção comercial de carotenoides utilizando coprodutos agrícolas como fontes de carbono com baixo valor de mercado, minimizando custos de produção.

3.5. Prospecção e seleção de micro-organismos produtores de carotenoides

A bioprospecção microbiana (ou “*screening*”) é uma das mais importantes atividades da microbiologia industrial, contribuindo para o conhecimento da biodiversidade, da ecologia, do metabolismo e possibilita a descoberta de micro-organismos com alto potencial para a produção de bens de interesse da indústria química, alimentícia, farmacêutica e agrícola. A produção microbiana de pigmentos, assim como outros biocorantes, apresenta como vantagens, o fato de que podem ser obtidas, em um curto prazo de tempo, em qualquer época do ano, em pequeno espaço, utilizando substratos de baixo custo, com controle das condições de cultivo, além de receberem a denominação de corantes naturais, como citado na literatura (VALDUGA et al., 2014).

Taskin et al. (2016) realizaram um *screening* de micro-organismos em solo de areia contaminado com efluente de fábrica de açúcar. Os ensaios de isolamento foram realizados em meio formulado com 12% de melão e sais minerais, incubado a 30 °C por 72 h. Foram isoladas 35 leveduras com capacidade de produzir carotenoides, mas somente 25 apresentaram capacidade de crescer em quantidade elevada de melão. A mais produtora foi a TR-29 que, por meio de uma análise de PCR, foi identificada como *R. glutinis*, apresentando uma produção em lipídeo de 5,5 g/L, com um teor de 35%, e 15,7 g/L de biomassa.

Libkind e Broock (2006) isolaram a *R. mucilaginosa* no habitat Patagônia por meio de amostras de solo, flores, frutos silvestres, água de rio e lagoa. O meio de isolamento, bem como o meio de cultivo, foi o YM modificado com sais ((NH₄)₂SO₄, KH₂(PO₄), MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O), incubado a 25 °C por 72 h. Foram selecionadas 15 leveduras com base em sua coloração. A mais produtora (0195) foi identificada por PCR como sendo *R. mucilaginosa*, apresentando 300 µg/g em carotenoide e 4,9 g/L em biomassa.

Por outro lado, Ortucu et al. (2017) desenvolveram um extrato de meio de cultivo usando sementes de nêspera (árvore de fruta subtropical). A partir do pó hidrolisado, utilizaram um meio específico de isolamento (10 g/L de extrato de nêspera, 20 g/L ágar e pH inicial 6) e obtiveram 37 cepas. Destas, somente sete apresentaram potencial de crescimento em 48 h de cultivo com caldo de nêspera. A levedura OE11 apresentou 4,71 g/L de biomassa, 1,88 g/L de lipídeos e com teor de 40%, sendo identificada como *R. glutinis*. No processo de otimização, a quantidade de biomassa máxima alcançada foi de 12,62 g/L, com 7,82 g/L de lipídeo e um teor de 62% na concentração de lipídeo em 132 h de cultivo com 130 rpm.

Yang et al. (2011) constataram que águas marinhas e o ambiente de cultivo de camarões apresentaram uma boa diversidade de micro-organismos com capacidade de produção de carotenoides. Eles isolaram 88 cepas de leveduras com capacidade de produção de carotenoides. As amostras obtidas foram de viveiros de cultivo de camarão e água marinha costeira de Zhanjiang na China. O meio de isolamento foi o YPD, inoculado a 28 °C por cinco dias. Já o meio de cultivo utilizado para avaliar a capacidade de bioprodução foi o YM modificado (1% de extrato de levedura, 2,5% de glicose, 0,2% de K₂HPO₄, 0,2% de KH₂PO₄, e 0,01% MgSO₄·7H₂O) a 28 °C, com 150 rpm, durante 72 h de cultivo. A *Rhizophyidium sphaerocarpum* teve o maior rendimento da biomassa (10,3 g/L), com 2,59 mg/L (244,1 µg/g) de carotenoide, seguido por *Sporidiobolus ruineniae* com 10,1 g/L em biomassa, com 2,04 mg/L (202,1 µg/g) em carotenoide e *R. mucilaginoso* com 9,9 g/L em biomassa e 1,70 mg/L (171,4 µg/g) em carotenoide.

Barahona et al. (2016) constataram que em regiões com clima desfavoráveis (ambientes extremos) e sobre o *stress* oxidativo induzido por radiação UV e de outros fatores prevalentes na região geleira União, situada na Antártida, é possível encontrar leveduras com capacidade de produção de carotenoides. Eles analisaram amostras de rocha da geleira, onde foram encontrados os gêneros de levedura *Collophora*, *Cryptococcus*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* e *Torrubiella*, todas com capacidade de produção em carotenoides, sugerindo uma resposta evolutiva para adaptação às condições nessa região.

Embora existam estudos de isolamento de levedura com capacidade de produção de carotenoide, muito pouco ainda foi feito, quando comparados a vários ambientes naturais e ecossistemas, ainda pouco explorados, espalhados ao redor do mundo.

Devido à vasta extensão territorial, o Brasil dispõe de vários biomas, dentre eles

o Cerrado, que ocupa dois milhões de quilômetros quadrados. Ele é considerado o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 25% do território (RIBEIRO et al., 2011). Abriga mais de 15 mil espécies de plantas e é considerado a savana de maior biodiversidade do mundo. Estima-se que de 70 a 100 mil espécies de fungos filamentosos estão contidos nesse bioma. Entretanto, pouco se sabe sobre as espécies de leveduras da região (SPERANDIO et al., 2015).

Até o presente momento não há nenhum estudo associado às leveduras produtoras de corantes isoladas do Cerrado e há poucos relatos sobre leveduras isoladas desse bioma tropical (MOREIRA et al., 2015; ARAÚJO, 2015).

3.6. Coprodutos industriais

Embora o desenvolvimento tecnológico de produção em carotenoides esteja bem avançado, o maior obstáculo ainda é a questão de custo. O uso de substratos comerciais complexos (extrato de malte e levedura, peptona) ainda apresenta alto custo. Por outro lado, o uso de metais não tóxicos e resíduos alimentares adequados pode substituir os compostos de preço elevado. Acredita-se que o custo de produção pode diminuir com a incorporação dos resíduos agrícolas. Vários resíduos e/ou coprodutos (água de maceração de milho, melaço de cana de açúcar, glicerol, melaço de beterraba, extrato de turfa, soro de leite e efluente de cerveja) já foram utilizados para produzir carotenoides (TASKIN et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2013; MACHADO e BURKERT, 2013; MARTIN et al. 1993). No entanto, outros tipos de resíduos ainda precisam ser investigados. Estima-se que cerca de $3,7 \times 10^9$ t de resíduos agrícolas e $1,3 \times 10^9$ t de resíduos alimentares são gerados anualmente em todo o mundo (CHANDI et al., 2010).

Petrik et al. (2014) observaram que são produzidos em todo mundo 6 milhões de toneladas por ano de borra de café. Dessa forma, este coproduto foi submetido a um pré-tratamento ácido, seguido de uma hidrólise enzimática. O meio formulado continha 150 g/L do coproduto, mais alguns sais ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; KH_2PO_4 ; MgSO_4), obtendo 3,68 mg/L em carotenoides, com 4,28 g/L em biomassa, para a levedura *R. mucilaginosa*.

Kot et al. (2015) constataram que, além de utilizar o coproduto para bioprodução, a levedura do gênero *Rhodotorula* pode diminuir a carga orgânica do mesmo. Eles verificaram a capacidade de biodegradação de águas residuárias de batatas desproteinizadas (fonte de nitrogênio) com glicerol (fonte de carbono) utilizando a levedura *R. glutinis*, obtendo uma redução em 77% na DQO (Demanda Química de

Oxigênio) e uma capacidade de assimilar 70% de glicerol e 20,34 g/L de biomassa, quando usado 50 g/L de glicerol com 5% de água residuária.

Chandi et al. (2010) utilizaram metodologia de superfície de resposta para maximizar a produção de carotenoides pela *R. glutinis* formulando um meio com resíduo de tomate (660 ml/L), extrato de malte (1,5 g/L), extrato de levedura (4,5 g/L), peptona (7,4 g/L) e glicose (10 g/L), obtendo 2918,34 µg/L em carotenoides e 4,38 g/L de biomassa.

Percebe-se que os coprodutos são uma boa fonte alternativa de meios de cultivo para bioprodução, diminuindo a exigência de outros nutrientes. Alguns coprodutos apresentam uma boa assimilação pela levedura do gênero *Rhodotorula*, como glicerol bruto, uma excelente fonte de carbono e a manipueira, por apresentar uma boa fonte de nitrogênio. Além disso, estes dois coprodutos apresentam uma gama de micronutrientes, que auxiliam no desenvolvimento celular do micro-organismo (KOT et al, 2015 e MOREIRA et al., 2015).

3.7. Glicerol

A geração de carotenoides microbianos pelas leveduras apresenta potencial para produção em larga escala. Entretanto, alguns desafios ainda precisam ser superados, como, por exemplo, as exigências nutricionais que as leveduras demandam. Uma boa forma de lidar com este fato seria a substituição parcial ou total por outra fonte de nutriente relativamente de menor custo.

O biodiesel, um produto industrialmente obtido da transesterificação do óleos vegetais e gorduras de origem animal, é um dos biocombustíveis alternativos consolidado na matriz energética mundial há alguns anos atrás. Mas tal processo de transformação acaba gerando o glicerol e para cada litro de biodiesel produzido forma-se 0,680 kg de glicerol com 40 a 85% de concentração. Sabe-se que o processo de purificação apresenta um custo elevado e que o uso direto na indústria química é difícil devido suas impurezas (SAENGE et al., 2011).

Era esperado que o mercado global de biodiesel chegasse a 140 bilhões de litros em 2016, apresentando um crescimento de até 42% ao ano e com uma produção de 15,1 bilhões de litros de glicerol com uma perspectiva de 148 bilhões de litros de biodiesel até 2024 (KONG et al., 2016).

Na União Europeia, já foram produzidos 12,5 milhões de metros cúbicos

(MCM) de biodiesel em 2014, sendo considerado a maior produtora no mundo. No Brasil, já foram produzidos 3,8 MCM, em 2015, sendo obtidos dois MCM de glicerol, boa parte exportado, devido à falta de uso (SCHWENGBER et al., 2016). Medidas alternativas do seu uso devem ser tomadas com urgência, como, por exemplo, o emprego como fonte de carbono para processos biotecnológicos.

Segundo Karomerou et al. (2016), analisou-se o potencial da *R. glutinis* para conversão de glicerol em lipídeos. Eles constataram que a melhor produção de lipídeos seria um meio formulado com 40 g/L de glicerol, 0,2 g/L de sulfato de amônia e 2 g/L de extrato de levedura, obtendo uma taxa de crescimento de 0,27 h, com 0,85 g/L em lipídeo apresentando um teor de 20%. Eles constataram, também, que valores acima de 40 g/L de coproduto podem inibir o crescimento e acúmulo em lipídeo no interior da célula.

Petrik et al. (2013) verificaram o cultivo de três linhagens de leveduras produtoras de carotenoides, sendo elas *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Cystofilobasidium*, as quais apresentaram crescimento satisfatório. Além disso, eles verificaram a capacidade de substituição da glicose pelo glicerol e a melhor relação foi uma para três partes de glicerol. A levedura *R. glutinis* apresentou uma quantidade em carotenoides de 1.944 µg/g, sendo que 1.197,4 µg/g em β-caroteno e com 12,38 g/L de biomassa, mostrando melhor produção no glicerol residual do que no glicerol purificado. Isso acontece devido à presença de micronutrientes no coproduto bruto, que estimulou o crescimento, como consta a Tabela 1.

Tabela 1: Composição físico-química do glicerol bruto

Componentes	Concentração	Componentes	Concentração
Cálcio (ppm)	11,0	Sódio (%)	1,20
Potássio (ppm)	***	Carbono (%)	26,0
Magnésio (ppm)	6,8	Nitrogênio (%)	0,04
Fósforo (ppm)	53,0	Enxofre (ppm)	***

*** Indica valores que estão abaixo do limite de detecção para o método. Fonte: Quispe et al. (2013).

Machado e Burket (2015) investigaram o uso potencial do substrato água de maceração de milho e glicerol bruto por meio de um delineamento experimental. A melhor concentração para ganho em termos de carotenoide foi com 30 g/L de glicerol

bruto e 52,9 g/L de água de maceração de milho, obtendo 779,60 µg/L (65,64 µg/g) em carotenoide, demonstrando que é possível obter um bioproduto através de meios formulados somente com coprodutos.

3.8. Manipueira

No processo de fabricação de farinha de mesa ou de amido de mandioca, ocorre a formação de Manipueira ou “*Cassava wastewater*”, uma água constitutiva da raiz ou suco celular, misturada à água de lavagem das raízes no momento da prensagem. Para cada quilo de mandioca fresca, gera-se 0,2 kg de amido, 0,4 a 0,9 kg de resíduo e 5 a 7 L de águas residuais ricas em carboidratos, nitrogênio e minerais (Tabela 2). Sabe-se que o Brasil é o segundo maior produtor de mandioca do mundo. No ano de 2012, a produção mundial foi de 26,2 milhões de toneladas, sendo a Nigéria, Indonésia, Brasil e Tailândia os países mais produtores (ROSA et al., 2016).

Tabela 2: Composição físico-química da manipueira

Componentes	Concentração	Componentes	Concentração
Umidade	93%	Magnésio	8 g/kg
Carbono orgânico	329 g/kg	Enxofre	2 g/kg
Açúcares redutores	37 g/L	Ferro	46 mg/kg
Nitrogênio total	26 g/kg	Zinco	13 mg/kg
Fósforo	4 g/kg	Manganês	20 mg/kg
Potássio	41 g/kg	Cobre	7 mg/kg
Cálcio	2 g/kg	pH	5,7

Fonte: Sentanin, 2011.

A Manipueira, por apresentar quantidade de hidratos de carbono satisfatória, pode representar um coproduto com potencial utilidade para diversas fermentações, como a obtenção de biosurfactantes, hidrogênio, metano e até carotenoide (ROSA et al., 2016; FAI et al., 2015; INTANOO et al., 2014). Há poucos relatos sobre esse último na literatura.

Sentanin (2011) realizou um delineamento experimental para melhorar a produção de carotenoide pela levedura *R. glutinis* usando meio de cultivo formulado com 100% de manipueira proveniente da fabricação de amido, bem como avaliou as condições de processo em seu estudo. A máxima produção de carotenoide ocorreu com

26 °C, com 250 rpm de agitação, pH inicial 7 e com 10% de inóculo obtendo 2.068 µg/L (162 µg/g) em carotenoides, sendo 2,3 vezes maior quando comparado ao meio complexo comercial YM com apenas 899 µg/L (186 µg/g), demonstrando uma adaptação fácil da levedura do gênero *Rhodotorula* ao coproduto.

Justificativa da pesquisa

Tendo em vista a vasta gama de trabalhos científicos enfatizando isolamentos de leveduras em várias regiões do mundo, percebe-se que o Brasil apresenta uma savana tropical praticamente inexplorada com grandes potenciais em termos biotecnológicos. Dessa forma, faz-se necessária uma abordagem em seu bioma, a fim de se obter cepas com potencial de produção em carotenoides.

O Brasil produz vários coprodutos ao longo de sua extensão territorial e foi relatada utilização de alguns coprodutos, nos quais o aumento do bioproduto pode chegar até 50%, quando comparado aos cultivos sem o coproduto. Percebe-se a necessidade de utilizar alguns coprodutos como glicerol e manipueira produzidos no país, a fim de diminuir custos relativos com substratos e um possível aumento na capacidade de produção pelas leveduras isoladas do bioma Cerrado brasileiro justificando, portanto, o objetivo da realização deste trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras

Neste estudo, foram coletadas amostras da biodiversidade ambiental contidas em solos, flores, folhas e frutos de um bioma Cerrado presente no Parque Estadual Serra Azul perto da cidade de Barra do Garças – MT (latitude -15.853707, longitude -52.256004) e em outras cidades circunvizinhas como Aragarças – GO (latitude -15.926710 e longitude -52.234504) e Pontal do Araguaia – MT (latitude -15.933081 e longitude -52.266782) com o mesmo bioma. Também foram efetuadas amostragem do bioma pertencente à UNESP - Campus de São José do Rio Preto – SP (latitude -20.785218 e longitude -49.359897).

Para a realização das coletas, foram escolhidos ambientes livres de contaminações por automóveis, pessoas ou animais. Foram utilizados recipientes termoplásticos de polietileno de alta densidade pré-esterilizados, para que não ocorresse

uma recontaminação após a coleta, sendo abertos no laboratório conforme indicado no item 4.2.

4.2. Isolamento das leveduras

As amostras coletadas do meio ambiente foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio *Yeast Malt* (YM) cuja composição foi: 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose, e incubadas a 25 °C por 48 h a 150 rpm. Após este período, foram inoculadas em placas de Petri com meio ágar YM a 25 °C por 120 h.

As colônias de leveduras que apresentaram coloração entre amarelo e vermelho foram novamente isoladas, pelo método de esgotamento em placa de Petri com meio ágar YM (25 °C por 120 h) (VALDUGA, 2007). A pureza do micro-organismo foi verificada por meio de exame microscópico segundo Cabral et al. (2011).

A partir das cepas isoladas e puras, foram realizadas as caracterizações dos micro-organismos utilizando meio seletivo para levedura PDA (23,5 g/L) contendo 50 mg/L de cloranfenicol (Neo Química) (CABRAL et al., 2011; PEREIRA et al., 2014). Os micro-organismos foram cultivados em placas de Petri a 25 °C por 120 h, com o antibiótico comercial, para confirmação de leveduras.

4.2.1. Manutenção da cepa

As leveduras pigmentadas foram mantidas em tubos de ensaios contendo ágar inclinado GYMP com (p/v) glicose 2,0%, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaHPO₄ 0,2% e ágar 2,0%, cobertas por uma camada de óleo mineral acima do ágar, e mantidas a -18 °C (COELHO et al., 2011). Repiques foram realizados a cada três meses.

4.3. Inóculo

Primeiramente, 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 repicadas 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, mantidas a 25 °C por 48 h. No término do processo, os cultivos foram homogeneizados e transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50

mL do caldo YM, previamente esterilizados a 121 °C por 15 min, incubados a 150 rpm, 25 °C por 48 h ou o tempo necessário para a contagem celular atingir 10^8 células/mL, verificada em câmara de Neubauer (VALDUGA, 2007).

4.4. *Bioprodução de carotenoides*

A bioprodução de carotenoides foi realizada em agitador orbital (Tecnal, TE 424, Brasil) por meio dos cultivos em Erlenmeyers de 250 mL com 90 mL do meio de produção YM a pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo (10 mL) iniciando o cultivo com 1×10^7 células/mL, sendo as condições operacionais do processo a 25 °C, 180 rpm por 168 h (RIOS et al., 2015).

As amostras foram coletadas no término do cultivo em 168 h para determinação da biomassa por meio do método gravimétrico, de pH e da concentração de carotenoides totais.

4.5. *Identificação da levedura*

Com base nos resultados obtidos no item 4.4, as melhores cepas de leveduras selecionadas passaram por uma análise de DNA (PCR) feita pela Micoteca URM - Universidade Federal de Pernambuco, onde estes micro-organismos identificados foram armazenados e ficaram disponíveis para qualquer pesquisador (Anexo 1).

4.6. *Maximização das condições de processo para bioprodução de carotenoides*

Visando a maximização da bioprodução dos carotenoides totais, foram utilizadas as melhores cepas de leveduras encontradas no item 4.4 (*R. glutinis*, *R. graminis*, *R. aurantiaca*, *R. lactosa* e *R. mucilaginosa*). Inicialmente, um delineamento composto central (DCC) 2^2 (4 ensaios + 3 pontos centrais) foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito das condições de processo: temperatura (25 °C a 35 °C) e agitação do meio de cultivo (130 rpm a 230 rpm), como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Valores utilizados no delineamento composto central (DCC) 2^2 com pontos centrais para verificar a influência dos fatores na bioprodução

Variáveis independentes/ Níveis	-1	0*	+1
Agitação (rpm)	130	180	230
Temperatura (°C)	25	30	35

*Ponto central. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A melhor condição de processo para a produção foi escolhida a partir dos resultados do planejamento. Dessa forma, as respostas avaliadas foram: produção de biomassa (g/L), concentração de específica carotenoides ($\mu\text{g/g}$) e concentração volumétrica de carotenoides ($\mu\text{g/L}$).

4.7. Maximização das condições de cultivo para bioprodução de carotenoides

Visando a maximização da bioprodução dos carotenoides totais, foram utilizadas as melhores cepas de leveduras encontradas no item 4.4 (*Rhodotorula lactosa*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*). Inicialmente foi realizado um planejamento experimental fracionário 2_{III}^{5-1} (16 ensaios e 4 pontos centrais), com a finalidade de avaliar o efeito da concentração dos componentes do meio de cultivo: extrato de levedura, extrato de malte, peptona, sacarose e pH inicial do meio de cultivo, como demonstrado na Tabela 4, tendo como resposta a biomassa e a produção volumétrica em carotenoides totais.

Tabela 4: Valores utilizados no planejamento fatorial 2^{5-1} com pontos centrais para verificar a influência dos fatores na bioprodução

Variáveis independentes/Níveis	-1	0*	+1
Extrato de levedura (g/L)	1	5,5	10
Extrato de malte (g/L)	1	5,5	10
Peptona (g/L)	1	5,5	10
Sacarose (g/L)	5	12,5	20
pH inicial	4,5	5,5	6,5

*Ponto central. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

O meio de produção utilizado foi escolhido a partir dos resultados do planejamento fracionário. Dessa forma, as variáveis significativas na bioprodução de pigmentos foram escolhidas e as faixas de estudo redefinidas, realizando um

planejamento experimental. As respostas avaliadas foram: produção de biomassa (g/L), concentração específica de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) e concentração volumétrica de carotenoides

4.8. Produção de carotenoides em batelada intermitente

Posterior à otimização, foi realizando um cultivo em batelada intermitente. Foi realizando a remoção de 50% do meio de cultivo. A outra parte do meio de cultivo contida no Erlenmeyers 500 mL (volume trabalhado 250 mL) foi considerada como inóculo para o novo meio previamente esterilizando. O meio de cultivo otimizado era composto por 30 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte, 2 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona, 0,2 g/L de KNO_3 e com pH inicial de 6,5, obtido do item 4.7. A levedura utilizada para este experimento foi a *R. mucilaginosa* (a mais produtora no item 4.7)

A renovação do meio de cultivo ocorreu no período de 120 h (máxima multiplicação celular), obtido esta informação na validação do experimento do item 4.7. Foi realizando um acompanhando cinético da evolução do pH, do crescimento celular, e da concentração volumétrica e específica de carotenoides. Sendo as condições de operacionais do processo a 25 °C, com 130 rpm e por 312 h (RIOS et al., 2015).

4.9. Produção de carotenoides microbianos em fontes alternativas de nutrientes

Posterior à otimização, foi realizada uma substituição do meio de cultivo comercial (YM) por substratos de custo inferior, como a manipueira, proveniente da Plaza Indústria e Comércio Ltda., localizada em Santa Maria da Serra – SP, o glicerol residual bruto, obtido pela empresa JBS Alimentos S/A, localizada em Lins – SP e o melaço de cana de açúcar da Bunge unidade Moema, localizada em Orindiúva – SP.

A produção de carotenoides foi realizada com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Primeiramente avaliou-se a faixa de tolerância do consumo dos coprodutos individualmente, e os níveis das concentrações estão na Tabela 5.

Tabela 5: Concentrações dos coprodutos para produção de carotenoides

Coproductos	Concentração g/L			
	20	40	60	80
Manipueira (g/L)	20	40	60	80
Melaço de cana de açúcar (g/L)	10	25	40	55
Glicerol (g/L)	10	25	40	55

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

4.10. Técnicas de ruptura celular

A extração dos carotenoides obtidos da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi realizada a partir de diferentes métodos de ruptura celular (químico, físico ou a combinação de ambos). Em todos os ensaios foi utilizada biomassa liofilizada (-50 °C por 48 h). A quantidade de amostra usada foi de 0,05 g e de solvente 2 mL (aproximadamente 2 g) tendo índice de saturação pelo solvente de 40 vezes (razão entre solvente por amostra). A mesma relação é descrita no item 4.12.3.

4.10.1. Técnicas químicas de ruptura celular

4.10.1.1. Ácido clorídrico, acético e lático

Foram utilizados 2 mL de uma solução de 4 mol/L dos ácidos acético e clorídrico e 5,55 mol/L para o ácido lático. As diferentes soluções foram adicionadas a 0,05 g de biomassa colocados tubo de ensaio, seguido por agitação em vórtex por 3 min (NI et al., 2008).

4.10.2. Técnicas mecânicas de ruptura celular

4.10.2.1. Abrasão com pérolas de vidro

Esta técnica foi adaptada a partir do procedimento descrito por Medeiros et al. (2008), que consiste em adicionar em um tubo de ensaio 2 mL de solvente seguindo de 0,05 g de biomassa acrescidos de 1,1 g/mL de pérolas de vidro ($0,5 < d < 0,59$ mm). A mistura final foi agitada em vórtex durante 1 min, em intervalos de 15 min, totalizando 1 h.

4.10.2.2. Banho ultrassônico

A técnica consiste em adicionar 2 mL de água ou solvente juntamente com 0,05

g de biomassa submetidos a 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 min, sendo a água do banho trocada a cada ciclo (MEDEIROS et al., 2008).

4.11. Métodos analíticos

4.11.1. Determinação da concentração de biomassa

Para a determinação da concentração celular, utilizou-se o método gravimétrico segundo AOAC (2000) após 168 h de cultivo, para prospecção de leveduras.

Para demais análises (planejamento, batelada intermitente e cultivo formulado com coprodutos) a concentração da biomassa, foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, através de uma curva padrão (KUSDIYANTINI et al., 1998), apêndice 1 ao 5.

4.11.2. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada por meio da leitura da amostra em medidor de pH segundo AOAC (2000).

4.11.3. Recuperação de carotenoides totais

A recuperação de carotenoides totais foi realizada conforme metodologias descritas anteriormente por Fonseca et al. (2011) e Michelon et al. (2012), adaptadas por Cipolatti et al. (2015). A biomassa foi centrifugada a 3439 x g por 10 min, transferida para placa de Petri e colocada em liofilizador por 48 h, posteriormente macerada em um gral (almofariz) e padronizada em peneira com Tyler 115 (CIPOLATTI et al., 2015). Posterior à etapa de padronização, a biomassa foi submetida a uma lise com o agente de ruptura dimetilsulfóxido - DMSO ((CH₃)₂SO), adicionada de 1,1 g/mL de pérolas de vidro, 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, seguida de centrifugação (3439 x g por 10 min). O sobrenadante foi separado e outra extração foi realizada até o branqueamento total da célula. No sobrenadante, obtido após a centrifugação, foram adicionadas soluções de NaCl 20% (p/v) e éter de petróleo, seguida de uma homogeneização. Após a formação das fases, foi coletada a fase polar e o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na₂SO₄), originando os extratos (MICHELON et al., 2012).

4.11.4. Determinação de carotenoides totais

A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro 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 de $A_{1cm}^{1\%} = 2592$), utilizando a equação 1 (DAVIES, 1976).

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

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).

4.11.5. Determinação da concentração de açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores foi realizada utilizando o método espectrofotométrico com 3–5 dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959), utilizando curva de glicose padrão cuja concentração variou entre 0,1 e 1,0 g/L (Apêndice 6).

4.12. Análise estatística

Para avaliação da cepa mais promissora, os ensaios foram realizados em triplicada seguidos por testes de diferença de médias (Tukey) a 5% de significância. Além disso, o desempenho da condição de processo foi verificado pela análise de variância (ANOVA).

Todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o *software* Statistica V 7.0 (StartSoft).

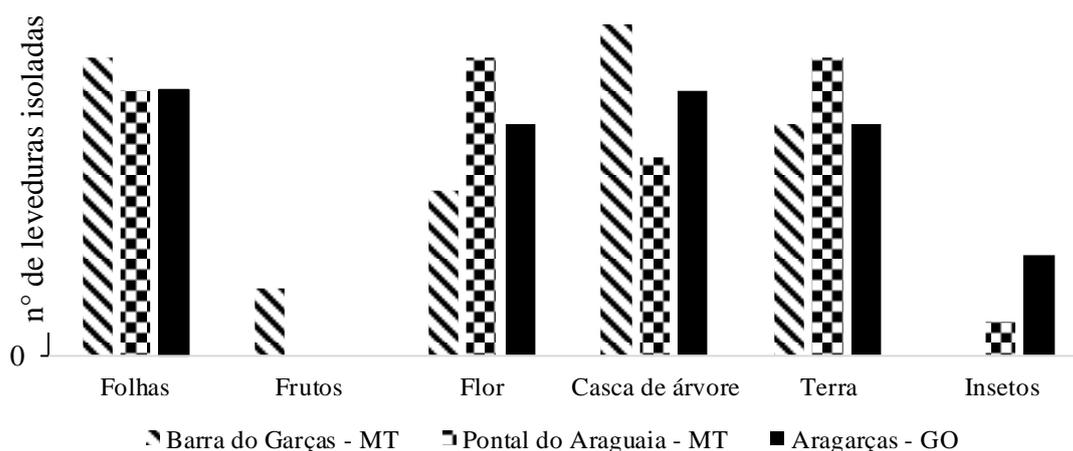
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e seleção de micro-organismos carotenogênicos

Foram coletadas 99 amostras ambientais pertencentes ao bioma Cerrado, das quais 25 eram de folhas, 2 de frutos, 24 de cascas de árvores, 21 de flores, 23 de solos e 4 de insetos (destas amostras, foram isoladas 470 colônias). Dentre elas, algumas apresentavam coloração do amarelo ao vermelho. Estas colônias que apresentavam coloração foram novamente isoladas, sendo 25 colônias com coloração alaranjada, 34 com colorações róseas e 10 que apresentaram coloração amarelada, totalizando 69 micro-organismos.

Os 69 micro-organismos isolados estão distribuídos conforme a Figura 2, de acordo com a fonte de isolamento bem como a cidade vizinha como referência de coleta.

Figura 2: Micro-organismos isolados em cada fonte de obtenção



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Já no bioma pertencente ao campus universitário de São José do Rio Preto, foram isoladas 30 colônias, sendo que destas oito apresentaram pigmentação laranja e rósea, com destaque para o gênero *Rhodotorula*. Resultados similares foram apresentados por Libkind e Broock (2006) que isolaram 15 colônias com capacidade de coloração vermelha, no ecossistema da Patagônia, sendo a maioria do gênero *Rhodotorula*, obtendo 300 $\mu\text{g/g}$ em carotenoides para a *R. mucilaginosa*.

As leveduras são onipresentes no meio ambiente e alguns estudos relatam o descobrimento de novas cepas, mas ainda há muitos ecossistemas a serem explorados. Otero (2011), por exemplo, conseguiu isolar 683 colônias das 147 amostras ambientais analisadas. Entretanto, somente 31 colônias de coloração variando do amarelo ao

vermelho foram encontradas no ecossistema do Escudo Sul-Riograndense, sendo o primeiro trabalho de isolamento dessa região.

Por outro lado, Chang et al. (2016) conseguiram 420 amostras ambientais de água do mar da costa de Taiwan, encontrando sete espécies novas, das quais uma delas *Rhodotorula* sp. Além disso, constatou-se que o gênero *Rhodotorula* é o mais abundante nessa região.

5.2. Prospecção fermentativa para produção de carotenoides

Foi determinada a capacidade de bioprodução de carotenoide dos 69 micro-organismo isolados. Nas Tabelas 6, 7 e 8, estão apresentados os parâmetros de crescimento das cepas isoladas, bem como a produção de caroteno e o pH final do cultivo, em meio YM ao final de 168 h. Neste tempo de cultivo, realizou-se uma avaliação estatística ($p < 0,05$) para selecionar as leveduras mais promissoras quanto a concentração volumétrica de carotenoides em cada classe de coloração (laranja, rósea e amarelo). A Figura 3 mostra as cores das leveduras obtidas após a remoção do meio de cultivo, a classificação era visual para as leveduras.

Figura 3: Classificação das leveduras pela coloração.



Fonte: Imagine do autor, 2018.

A Tabela 6 apresenta a característica de biomassa, pH final e concentração de carotenoides de 34 micro-organismos isolados. Os valores médios totais de carotenoides, tanto específicos como volumétricos, variaram na classificação da coloração laranja. A menor produção foi observada para a 23DS com 48,40 $\mu\text{g/L}$ (13,08 $\mu\text{g/g}$), enquanto a máxima obtida foi para QWRR com 776,67 $\mu\text{g/L}$ (194,17 $\mu\text{g/g}$). A respeito do crescimento celular, a variação foi de 2,95 g/L para IKDS e a máxima observada para LIDO com 6,60 g/L. Quanto ao pH final do cultivo, o menor pH foi para IOHL com valor médio de 7,55 e o maior foi para a levedura YHDS com 8,83. Observou-se que, dentre as leveduras que apresentam coloração laranja, a mais promissora frente a produção de carotenoides foi a QWRR, isolada de amostra de solo próximo a cidade de Barra do Garças – MT do Parque Serra azul.

Tabela 6: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado. Pigmentação Alaranjada

Cepa	Biomassa (g/L)	pH	CEC ($\mu\text{g/g}$)	CVE ($\mu\text{g/L}$)
DEFA	3,27 \pm 0,17 ^{kl}	8,53 \pm 0,01 ^{efgh}	104,94 \pm 3,21 ^{bc}	339,85 \pm 10,48 ^{cde}
IOHL	5,4 \pm 0,17 ^b	7,55 \pm 0,04 ⁿ	40,35 \pm 7,34 ^{ghij}	217,88 \pm 39,62 ^{ghijk}
DAF7	3,83 \pm 0,07 ^{ghij}	8,14 \pm 0,14 ^l	47,97 \pm 1,50 ^{fghi}	183,90 \pm 5,74 ^{ijkl}
ERT8	4,30 \pm 0,03 ^{efg}	8,51 \pm 0,01 ^{fghi}	75,20 \pm 5,25 ^{de}	324,83 \pm 22,57 ^{def}
NDA3	3,58 \pm 0,08 ^{jk}	8,65 \pm 0,01 ^{cde}	24,78 \pm 4,88 ^{jk}	88,82 \pm 17,48 ^{mn}
32RR	4,53 \pm 0,03 ^{de}	8,22 \pm 0,02 ^{kl}	54,10 \pm 2,30 ^{fg}	245,26 \pm 10,41 ^{fghij}
DDD2	3,25 \pm 0,065 ^{kl}	8,67 \pm 0,03 ^{bcd}	39,75 \pm 9,20 ^{ghijk}	129,20 \pm 29,89 ^{lmn}
8Y87	3,90 \pm 0,1 ^{fghij}	8,74 \pm 0,01 ^{abcd}	31,26 \pm 0,09 ^{ijk}	121,90 \pm 0,36 ^{lmn}
8XV8	3,80 \pm 0,03 ^{hij}	8,73 \pm 0,01 ^{abcd}	40,58 \pm 1,30 ^{ghijk}	154,19 \pm 4,96 ^{klm}
2VCX	4,78 \pm 0,02 ^{cd}	8,22 \pm 0,02 ^{kl}	41,07 \pm 0,16 ^{ghijk}	196,43 \pm 0,78 ^{hijkl}
ZDFO	4,27 \pm 0,07 ^{efgh}	8,48 \pm 0,03 ^{ghi}	93,49 \pm 0,94 ^{cd}	399,89 \pm 4,00 ^{bcd}
LIDO	6,60\pm0,01^a	7,87 \pm 0,03 ^m	67,47 \pm 4,37 ^{ef}	445,29 \pm 28,86 ^b
TRET	4,13 \pm 0,03 ^{efghi}	8,67 \pm 0,02 ^{bcd}	41,79 \pm 5,46 ^{ghijk}	172,72 \pm 20,62 ^{jklm}
90FA	4,23 \pm 0,03 ^{efgh}	8,45 \pm 0,03 ^{hij}	64,05 \pm 19,93 ^{efg}	271,13 \pm 84,37 ^{efghi}
89DA	3,75 \pm 0,08 ^{ij}	8,65 \pm 0,02 ^{cde}	114,68 \pm 7,62 ^b	430,03 \pm 28,57 ^b
90DE	4,37 \pm 0,03 ^{def}	8,80 \pm 0,10 ^{ab}	32,91 \pm 2,37 ^{hijk}	143,71 \pm 10,34 ^{klmn}

Média \pm desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = Carotenoide específico de carotenoides; CVC = Carotenoide volumétrico de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 6 Continuação: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado.

Pigmentação Alaranjada

Cepa	Biomassa (g/L)	pH	CEC ($\mu\text{g/g}$)	CVE ($\mu\text{g/L}$)
87DS	5,50 \pm 0,01 ^b	8,32 \pm 0,03 ^{jk}	76,22 \pm 8,86 ^{de}	419,19 \pm 48,76 ^{bc}
23DS	3,70 \pm 0,1 ^{ijk}	8,71 \pm 0,01 ^{abcd}	13,08 \pm 1,35 ^k	48,40 \pm 4,99 ⁿ
QW13	3,70 \pm 0,1 ^{ijk}	8,65 \pm 0,01 ^{def}	37,95 \pm 3,31 ^{hgijk}	140,43 \pm 12,23 ^{klm}
ÇLDS	3,70 \pm 0,1 ^{ijk}	8,61 \pm 0,01 ^{defg}	32,50 \pm 3,10 ^{hijk}	120,24 \pm 11,45 ^{lmn}
2WDV	3,70 \pm 0,1 ^{ijk}	8,70 \pm 0,02 ^{abcd}	50,26 \pm 0,84 ^{fghi}	185,96 \pm 3,10 ^{ijkl}
DESD	5,05 \pm 0,06 ^{bc}	8,39 \pm 0,03 ^{ij}	55,84 \pm 4,08 ^{efg}	281,71 \pm 20,57 ^{efgh}
QWRR	4,00 \pm 0,1 ^{fghij}	8,48 \pm 0,03 ^{ghi}	194,17\pm13,43^a	776,67\pm53,73^a
IKDS	2,95 \pm 0,05 ^l	8,79 \pm 0,10 ^{abc}	102,56 \pm 8,91 ^{bc}	302,56 \pm 26,28 ^{efg}
YHDS	3,65 \pm 0,05 ^{jk}	8,83 \pm 0,01 ^a	52,34 \pm 0,37 ^{fgh}	191,05 \pm 1,34 ^{ijkl}

Média \pm desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = Carotenoide específico de carotenoides; CVC = Carotenoide volumétrico de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Dentre os micro-organismos isolados do bioma Cerrado com a classificação de coloração rósea, a capacidade de produção de carotenoides, crescimento celular e pH final são apresentados na Tabela 7. Foi observado que o crescimento celular apresentou uma variação de 3,98 g/L (FOD3) até 7,2 g/L (78DA). Já o pH variou entre 7,62 (NOVD) a 8,55 (TGDS). Na concentração volumétrica de carotenoides, foi constatado que duas leveduras se destacaram como maiores produtoras de caroteno, sendo a NGG3 com 671,75 $\mu\text{g/L}$ (124,79 $\mu\text{g/g}$) e a ADSF 790,31 $\mu\text{g/L}$ (118,84 $\mu\text{g/g}$). A variação na produção em carotenoides foi de 790,31 $\mu\text{g/L}$ (118,84 $\mu\text{g/g}$) para ADSF e a menor produtora foi a 9UFF com 88,95 $\mu\text{g/L}$ (12,89 $\mu\text{g/g}$). Portanto, observa-se que, dentre as leveduras com coloração rósea, a NGG3 e ADSF foram as que apresentaram maior capacidade de produção do carotenoide, mesmo sem possuir os maiores valores de biomassa. Estas duas leveduras foram obtidas de amostras de flores perto da cidade de Aragarças – GO.

Tabela 7: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado. Pigmentação

Rósea

Cepa	Biomassa (g/L)	pH	CEC ($\mu\text{g/g}$)	CVC ($\mu\text{g/L}$)
EDGE	5,73 \pm 0,2 ^{fgh}	8,04 \pm 0,04 ^{hijklm}	52,36 \pm 3,06 ^{fghi}	300,19 \pm 17,52 ^{defghijk}
FEFA	5,43 \pm 0,3 ^{ghijkl}	8,17 \pm 0,01 ^{efghij}	73,98 \pm 7,00 ^{bcdef}	401,97 \pm 38,03 ^{bcdefgh}
OUI2	5,27 \pm 0,17 ^{ijklm}	8,13 \pm 0,13 ^{fghijk}	64,67 \pm 7,87 ^{cdefgh}	340,61 \pm 41,46 ^{cdefghijk}
12UI	5,85 \pm 0,05 ^{efg}	8,04 \pm 0,04 ^{hijklm}	57,45 \pm 2,76 ^{efghi}	336,11 \pm 16,13 ^{cdefghijk}
ADSF	6,65 \pm 0,12 ^{bc}	7,97 \pm 0,18 ^{klmno}	118,84\pm30,57^a	790,31\pm203,28^a
OJF3	5,40 \pm 0,01 ^{ghijkl}	8,13 \pm 0,12 ^{fghijk}	76,44 \pm 8,37 ^{bcde}	412,76 \pm 45,20 ^{bcdef}
78DA	7,2\pm0,1^a	7,9 \pm 0,1 ^{lmn}	72,15 \pm 4,68 ^{bcdef}	519,44 \pm 33,71 ^b
NGG3	5,38 \pm 0,08 ^{ghijkl}	8,25 \pm 0,3 ^{defgh}	124,79\pm10,89^a	671,75\pm58,64^a
T9UF	6,20 \pm 0,1 ^{cde}	8,44 \pm 0,06 ^{abcd}	39,43 \pm 4,40 ^{ij}	244,42 \pm 27,20 ^{ijkl}
TCU0	4,82 \pm 0,02 ^{mno}	8,42 \pm 0,03 ^{abcd}	57,51 \pm 4,10 ^{efghi}	277,02 \pm 19,73 ^{efghijk}
9UFF	6,90 \pm 0,03 ^{ab}	7,95 \pm 0,01 ^{klmno}	12,89 \pm 0,76 ^k	88,95 \pm 5,24 ^m
ZD9D	5,55 \pm 0,05 ^{ghijk}	8,52 \pm 0,01 ^{ab}	59,64 \pm 2,23 ^{efghi}	330,99 \pm 12,38 ^{cdefghijk}
VAI2	5,72 \pm 0,02 ^{fghi}	8,46 \pm 0,02 ^{abcd}	47,06 \pm 5,46 ^{ghij}	269,03 \pm 31,19 ^{fghijkl}
DDDI	5,68 \pm 0,02 ^{fghij}	7,87 \pm 0,01 ^{mn}	62,26 \pm 1,37 ^{defghi}	353,86 \pm 7,81 ^{cdefghij}
FOD3	3,98 \pm 0,68 ^p	8,46 \pm 0,03 ^{abcd}	50,55 \pm 3,01 ^{fghi}	201,35 \pm 11,98 ^{klm}
FODD	6,07 \pm 0,01 ^{def}	8,30 \pm 0,01 ^{cdefg}	44,34 \pm 0,70 ^{hij}	268,98 \pm 4,27 ^{fghijkl}
SAVE	6,40 \pm 0,03 ^{cd}	7,81 \pm 0,04 ^{no}	68,30 \pm 2,77 ^{bcdefg}	437,11 \pm 17,72 ^{bcd}
DESD	6,93 \pm 0,01 ^{ab}	8,10 \pm 0,04 ^{ghijkl}	50,81 \pm 4,16 ^{fghi}	352,12 \pm 28,84 ^{cdefghij}
NOVD	5,05 \pm 0,05 ^{lmno}	7,62 \pm 0,012 ^o	77,19 \pm 6,21 ^{bcde}	389,80 \pm 31,37 ^{bcdefgh}
89DA	5,45 \pm 0,05 ^{ghijkl}	8,03 \pm 0,04 ^{ijklmno}	40,36 \pm 1,46 ^{ij}	219,96 \pm 7,97 ^{ijklm}
VOND	4,85 \pm 0,01 ^{mno}	8,25 \pm 0,01 ^{defgh}	26,62 \pm 0,68 ^{jk}	129,11 \pm 3,28 ^{lm}
DUIN	5,10 \pm 0,1 ^{klmno}	7,93 \pm 0,08 ^{klmno}	43,76 \pm 1,21 ^{hij}	222,81 \pm 6,15 ^{ijklm}
TTYD	4,80 \pm 0,01 ^{no}	7,98 \pm 0,04 ^{ijklmno}	86,37 \pm 6,29 ^{bc}	414,56 \pm 30,21 ^{bcde}
UUDV	4,85 \pm 0,15 ^{mno}	8,29 \pm 0,03 ^{cdefg}	90,39 \pm 2,86 ^b	438,40 \pm 13,89 ^{bcd}
OODS	5,75 \pm 0,05 ^{efgh}	8,41 \pm 0,04 ^{abcd}	60,17 \pm 0,33 ^{efghi}	345,98 \pm 1,88 ^{cdefghij}
90DA	4,65 \pm 0,05 ^o	7,96 \pm 0,06 ^{klmno}	71,56 \pm 3,22 ^{bcdef}	329,77 \pm 14,99 ^{cdefghijk}
4RFE	4,85 \pm 0,05 ^{mno}	8,33 \pm 0,05 ^{bcdef}	84,53 \pm 10,96 ^{bcd}	409,96 \pm 53,16 ^{bcdefg}
7DUS	5,80 \pm 0,01 ^{efgh}	8,10 \pm 0,07 ^{ghijkl}	58,78 \pm 4,32 ^{efghi}	340,93 \pm 25,08 ^{cdefghijk}

Média \pm desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC. = Carotenoide específico de carotenoides; CVC = Carotenoide volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 7 Continuação: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do cerrado.

Pigmentação Rósea

Cepa	Biomassa (g/L)	pH	CEC (µg/g)	CVC (µg/L)
1QWA	5,25±0,05 ^{ijklmn}	8,42±0,05 ^{abcd}	50,55±2,66 ^{fghi}	265,37±13,97 ^{hijkl}
78SD	5,45±0,05 ^{ghijkl}	8,36±0,07 ^{abcde}	59,80±0,84 ^{efghi}	325,90±4,60 ^{cdefghijk}
TGDS	5,25±0,05 ^{ijklmn}	8,55±0,01 ^a	87,92±2,50 ^{bc}	461,59±13,14 ^{bc}
890S	7,00±0,1 ^{ab}	7,83±0,11 ^{mn}	52,08±0,63 ^{fghi}	364,59±4,43 ^{cdefghi}

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p<0,05$). CEC. = Concentração específico de carotenoides; CVC = Carotenoide volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para as leveduras de coloração amarela, Tabela 8, verificou-se que o 2EDS diferiu estatisticamente ($p<0,05$) na produção de carotenoides totais (285,58 µg/L) em relação aos demais. Ao mesmo tempo, na análise morfológica por microscópio e no teste de antibiótico em meio seletivo, foi possível verificar que das 10 cepas isoladas de coloração amarela somente uma era levedura (2EDS) e, as demais, bactérias. A biomassa apresentou uma variação de 1,15 g/L (89UF), a menos produtora, para a máxima com 5,65 g/L (2EDS). O pH apresentou uma ligeira mudança de 8,91 (89UF) para 8,18 (POP3). Na concentração específica de carotenoides, o maior valor observado foi para 89UF com 134,96 µg/g, sendo a POIU a menos produtora, com 15,96 µg/g. Já a concentração volumétrica apresentou uma variação de 57,97 (POIU) para 285,58 µg/L (2EDS). A levedura com maior bioprodução de corantes foi encontrada em amostras ambientais de solo perto da cidade de Aragarças – GO.

Tabela 8: Produção de carotenoides pelas micro-organismos isoladas do cerrado. Pigmentação Amarelada

Cepa	Biomassa (g/L)	pH	CEC (µg/g)	CVC (µg/L)
POP3	4,28±0,2 ^b	8,18±0,02 ^e	51,37±3,37 ^b	220,03±14,45 ^b
89AF	3,85±0,15 ^c	8,48±0,02 ^c	44,39±5,55 ^{bc}	170,89±21,35 ^c
97FD	3,22±0,02 ^e	8,48±0,02 ^c	53,37±5,16 ^b	171,67±16,60 ^c

Letras minúsculas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p<0,05$). CEC = Carotenoide específico de carotenoides; CVC = Carotenoide volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 8 Continuação: Produção de carotenoides pelas micro-organismos isoladas do cerrado. Pigmentação Amarelada

Cepa	Biomassa (g/L)	pH	CEC ($\mu\text{g/g}$)	CVC ($\mu\text{g/L}$)
09ER	3,21 \pm 0,03 ^e	8,88 \pm 0,03 ^{ab}	49,74 \pm 5,62 ^b	159,40 \pm 18,00 ^{cd}
ADF3	3,94 \pm 0,17 ^{bc}	8,67 \pm 0,01 ^c	48,57 \pm 3,98 ^b	191,30 \pm 15,69 ^{bc}
BFD2	3,75 \pm 0,08 ^c	8,89 \pm 0,02 ^{ab}	32,55 \pm 4,03 ^{cd}	122,06 \pm 15,12 ^{de}
89UF	1,15 \pm 0,08 ^f	8,91 \pm 0,06 ^a	134,96\pm5,69^a	155,20 \pm 6,54 ^{cd}
HGID	3,38 \pm 0,28 ^{de}	8,53 \pm 0,03 ^d	26,38 \pm 2,92 ^{de}	89,24 \pm 9,89 ^{ef}
2EDS	5,65 \pm 0,05 ^a	8,88 \pm 0,01 ^{ab}	50,54 \pm 1,00 ^b	285,58\pm5,62^a
POIU	3,60 \pm 0,1 ^{cd}	8,82 \pm 0,01 ^b	15,96 \pm 0,62 ^e	57,97 \pm 2,24 ^f

Letras minúsculas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = Carotenoide específico de carotenoides; CVC = Carotenoide volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

No bioma universitário, os resultados da bioprodução de biomassa e carotenoides (específico e volumétrico) estão apresentados na Tabela 9. Os resultados mostram que a levedura mais produtora em corantes (635,94 $\mu\text{g/L}$) e crescimento celular (6,30 g/L) foi a UYG9. A concentração volumétrica em carotenoides variou de 283,35 (RTH6) a 635,94 $\mu\text{g/L}$ (UYG9). Já a concentração específica foi de 56,84 (RTH6) para 122,46 $\mu\text{g/g}$ (EGE5) e a biomassa de 3,27 (UG10) a 6,30 g/L (UYG9).

Tabela 9: Produção de carotenoides pelas leveduras isoladas do Campus Universitário

Cepas	Coloração	Biomassa (g/L)	CEC ($\mu\text{g/g}$)	CVC ($\mu\text{g/L}$)
XPS2	Rósea	5,42 \pm 0,12 ^b	107,90 \pm 7,14 ^{ab}	584,48 \pm 38,70 ^{ab}
DRG3	Rósea	5,27 \pm 0,03 ^{bc}	108,51 \pm 3,64 ^{ab}	571,51 \pm 19,16 ^{ab}
EGE5	Laranja	3,88 \pm 0,13 ^e	122,46\pm3,53^a	474,55 \pm 18,03 ^c
RTH6	Rósea	4,98 \pm 0,15 ^c	56,84 \pm 4,10 ^d	283,35 \pm 20,42 ^d
UJH7	Rósea	4,60 \pm 0,17 ^d	111,69 \pm 3,35 ^{ab}	513,78 \pm 21,76 ^{bc}
ODK8	Laranja	6,18 \pm 0,08 ^a	88,29 \pm 7,27 ^c	545,94 \pm 44,97 ^{bc}
UYG9	Laranja	6,30 \pm 0,03 ^a	100,94 \pm 9,21 ^{bc}	635,94\pm58,01^a
UG10	Laranja	3,27 \pm 0,17 ^f	104,03 \pm 3,21 ^b	339,85 \pm 10,48 ^c

Letras minúsculas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = Carotenoide específico de carotenoides; CVC = Carotenoide volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Por fim, a Tabela 10 resume as leveduras que apresentaram melhor produção de corante dentre as classes de cores (laranja, rosa e amarela), encontradas tanto no bioma cerrado como no campus universitário.

Tabela 10: Produção de carotenoides pelas principais leveduras isoladas

Cepas	Coloração	Biomassa (g/L)	CEC ($\mu\text{g/g}$)	CVC ($\mu\text{g/L}$)
QWRR	Laranja	4,00 \pm 0,1	194,17 \pm 13,43	776,67 \pm 53,73
ADSF	Rosa	6,65 \pm 0,12	118,84 \pm 30,57	790,31 \pm 203,28
NGG3	Rosa	5,38 \pm 0,08	124,79 \pm 10,89	671,75 \pm 58,64
2EDS	Amarelada	5,65 \pm 0,05	50,54 \pm 1,00	285,58 \pm 5,62
UYG9	Laranja	6,30 \pm 0,03	100,94 \pm 9,21	635,94 \pm 58,01

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

5.3. Seleção e identificação das leveduras

Os resultados obtidos por meio da prospecção fermentativa realizada nas condições de operação apontaram micro-organismos potenciais para produção de carotenoides. Estes foram submetidos a análise molecular – DNA (PCR) e foram identificados como: *Rhodotorula lactosa* (QWRR) de coloração alaranjada, *Rhodotorula aurantiaca* (2EDS) com coloração amarelada, *Rhodotorula glutinis* (ADSF) e *Rhodotorula graminis* (NGG3) ambas com coloração rósea e *Rhodotorula mucilaginosa* (UYG9) de coloração laranja. Estes micro-organismos foram identificados e depositados no Banco de dados da Micoteca localizado em Recife – PE, disponíveis para qualquer pesquisador. Encontra-se no ANEXO 1 o laudo da identificação, assim como o número de registro on-line, para consulta.

Alguns micro-organismos isolados das geleiras glaciais recebiam uma nomenclatura semelhante à região, como a *R. aurantiaca* isolada da Antártica, nos primeiros isolamentos desse continente. Hoje sabe-se que muitos micro-organismos estão espalhados pelo mundo. A *R. aurantiaca* pode ser encontrada em solo contaminado de resíduo de óleo (SILVA, 2015), lagoas (SAMPAIO, 1994), ou até no bioma tropicais, como o cerrado.

5.4. Maximização das condições de processo por delineamento experimental

Realizou-se um planejamento experimental para avaliar as condições de processo para as leveduras identificadas do item 5.3.

Sabe-se que a metodologia de superfície de resposta é uma ferramenta que avalia os efeitos de fatores utilizando uma quantidade pequena e satisfatória de experimentos,

procurando sempre melhores condições de fatores para a resposta desejada. Os fatores ou variáveis independentes (temperatura, agitação), seus níveis, valores reais e resultados das respostas estudadas estão apresentados na Tabela 11.

É possível verificar uma variação nas respostas, com a máxima concentração volumétrica de carotenoides de 22,51 (ensaio 4) a 894,74 $\mu\text{g/L}$ (ensaio 1) para a levedura *R. lactosa*. A mesma levedura também se destaca para concentração específica de carotenoides com faixa entre 18,25 (ensaio 4) a 188,4 $\mu\text{g/g}$ (ensaio 1) e a concentração de biomassa de 0,9 (ensaio 3) a 5,05 g/L (ensaio 1 e 2). Observa-se que a levedura *R. lactosa* é a maior produtora de carotenoides dentre as 4 leveduras estudadas.

Para a levedura *R. glutinis*, observa-se uma variação nas respostas, com a concentração volumétrica de carotenoides de 77,24 (ensaio 4) a 753,11 $\mu\text{g/L}$ (ensaio 1), concentração específica de 19,24 (ensaio 4) a 92,52 $\mu\text{g/g}$ (ensaio 1) e a concentração de biomassa de 2,97 (ensaio 3) a 8,14 g/L (ensaio 1), conforme mostra a Tabela 11. Observa-se que a levedura *R. glutinis* é a segunda maior produtora de carotenoides volumétricos.

A levedura *R. graminis* se destaca na concentração específica de carotenoides 188,20 $\mu\text{g/g}$ (ensaio 3), mas a mesma também apresenta variação nas respostas, com a concentração volumétrica de carotenoides de 145,62 (ensaio 4) a 638,93 $\mu\text{g/L}$ (ensaio 1), concentração específica de 37,85 (ensaio 7) a 188,20 $\mu\text{g/g}$ (ensaio 3) e concentração de biomassa de 1,67 (ensaio 4) a 6,8 g/L (ensaio 1).

A levedura *R. aurantiaca* também apresenta variação nas respostas, com a concentração volumétrica de carotenoides de 73,31 (ensaio 5) a 352,47 $\mu\text{g/L}$ (ensaio 1), concentração específica de 17,32 (ensaio 5) a 81,97 $\mu\text{g/g}$ (ensaio 1) e concentração de biomassa de 1,8 (ensaio 3) a 4,75 g/L (ensaio 2), conforme mostra a Tabela 11.

Para a levedura *R. mucilaginosa* a concentração volumétrica de carotenoides foi de 679,15 $\mu\text{g/L}$ apresentando uma variação nas suas respostas, como uma concentração específica de 17,49 (ensaio 4) a 91,78 (ensaio 1), concentração volumétrica de 63,85 (ensaio 4) a 679,15 (ensaio 1) e concentração de biomassa de 2,7 (ensaio 3) a 7,4 (ensaio 1).

Em geral, observa-se que a maior concentração volumétricas e específicas de carotenoides, assim como a concentração celular estão no menor nível de agitação e temperatura, indicando uma provável necessidade de diminuição da faixa de agitação e temperatura.

Nota-se na Tabela 11 que a condição do ensaio 1, com agitação de 130 rpm e temperatura de 25 °C, resultou nas maiores respostas para bioprodução de carotenoides volumétricos para a levedura *R. lactosa* (894,74 µg/L), *R. glutinis* (753,11 µg/L), *R. aurantiaca* (352,47 µg/L) e *R. mucilaginosa* (6679,15 µg/L) em 144h h de cultivo com pH inicial de 5.

Nesse estudo de condições de maximização da bioprodução, conseguiu-se aumentar em 20% a concentração volumétrica de carotenoides para a levedura *R. lactosa* e 19% para a levedura *R. aurantiaca*. Por outro lado, o meio de cultivo usado para prospecção leveduras e modificação de processo (agitação e temperatura), está longe de ser o ideal, pois não apresenta alto valores de fonte de carbono e uma baixa quantidade da fonte de nitrogênio, por tanto, os ganhos alcançados são significativos.

Por fim, é necessário um estudo sobre a concentração de nutrientes que compõe o meio de cultivo YM (glicose, extrato de malte, extrato de levedura, peptona, pH inicial). Por se tratar de um meio formulado com 6 fatores se faz o uso de um delineamento experimental fatorial fracionado, para seleção dos fatores que influênciam a bioprodução proporcionando maior ganho em carotenoides (MACHADO, 2013; OTERO, 2012; SENTANIN, 2011).

Tabela 11: Delineamento composto central 2² (valores reais e codificados) para maximização das condições de processo, agitação e temperatura

Ensaio	Fatores independente		<i>R. glutinis</i>			<i>R. graminis</i>			<i>R. aurantiaca</i>		
	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉
1	130 (-1)	25 (-1)	8,14	92,52	753,11	6,8	93,96	638,93	4,3	81,97	352,47
2	230 (+1)	25 (-1)	7,21	73,36	528,55	6,3	100,30	631,90	4,75	72,14	342,67
3	130 (-1)	35 (+1)	2,97	53,74	159,59	3,35	188,20	630,46	1,8	78,43	141,18
4	230 (+1)	35 (+1)	4,02	19,24	77,24	1,67	87,37	145,62	3,33	25,8	86,06
5	180 (0)	30 (0)	7,48	61,53	460,27	5,8	42,20	253,22	4,2	17,32	73,31
6	180 (0)	30 (0)	7,48	59,97	448,59	6	43,61	261,68	4,2	17,95	76
7	180 (0)	30 (0)	7,81	61,17	477,75	6,2	37,85	227,11	4,3	18,59	78,7

X₁ = Agitação (rpm); X₂ = Temperatura (°C); Y_(1, 4, 7, 10 e 13) = Biomassa (g/L); Y_(2, 5, 8, 11 e 14) = Concentração específica de carotenoides (µg/g); Y_(3, 6, 9, 12 e 15) = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 11 Continuação: Delineamento composto central 2² (valores reais e codificados) para maximização das condições de processo, agitação e temperatura

Ensaio	Fatores independente		<i>R. lactosa</i>			<i>R. mucilaginoso</i>		
	X ₁	X ₂	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁₄	Y ₁₅
1	130 (-1)	25 (-1)	5,05	188,4	894,74	7,4	91,78	679,15
2	230 (+1)	25 (-1)	5,05	146,27	738,67	6,55	66,69	436,83
3	130 (-1)	35 (+1)	0,9	25,35	31,27	2,7	48,85	131,89
4	230 (+1)	35 (+1)	1,23	18,25	22,51	3,65	17,49	63,85
5	180 (0)	30 (0)	4,05	105,51	434,34	6,8	55,94	385,95
6	180 (0)	30 (0)	4,2	99,12	408,04	6,8	54,52	376,29
7	180 (0)	30 (0)	4,1	100,43	413,43	7,1	55,61	383,74

X₁ = Agitação (rpm) e X₂ = Temperatura (°C). Y_(1, 4, 7, 10 e 13) = Biomassa (g/L), Y_(2, 5, 8, 11 e 14) = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y_(3, 6, 9, 12 e 15) = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A Tabela 12 mostra os resultados encontrados com a combinação da agitação com a temperatura. Percebe-se para as leveduras *R. glutinis*, *R. aurantiaca*, *R. lactosa* e *R. mucilaginosa*, boa parte dos resultados são obtidos com a agitação de 130 rpm na combinação de 25 °C. Além disso, a temperatura foi o fator que mais influenciou negativamente na concentração volumétrica de carotenoides, para as leveduras citadas anteriormente, quando é observado os experimentos 2 e 3 da Tabela 11. Ou seja, aumentando a agitação de 130 para 230 rpm não ocorre grandes prejuízos na bioprodução, já a temperatura quando elevada de 25 para 35 °C verifica-se uma perda significativa de carotenoides. A Tabela 12 apresenta os melhores resultados em função da agitação e temperatura.

Tabela 12: Produção de carotenoides em função da combinação de agitação e temperatura

Cepas	Biomassa (g/L)	Cart. Esp. (µg/g)	Cart. Vol. (µg/L)
<i>Rhodotorula glutinis</i> ¹	8,14±0,10*	92,52±2,52	753,11±16,11
<i>Rhodotorula graminis</i> ¹	6,8±0,08	93,96±2,18	638,93±14,84
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> ¹	4,3±0,05	81,97±6,78	352,47±29,17
<i>Rhodotorula lactosa</i> ¹	5,05± 0,15	188,4± 13,27	894,74± 37,59
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ¹	7,40±0,40	91,78±4,40	679,15±32,59

*Média ± desvio padrão. 1 – Agitação de 130 rpm e temperatura de 25 °C. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

5.4.1. Verificação dos modelos para as respostas produção de carotenoides (volumétrica e específica) e de biomassa para a levedura *R. glutinis*

Considerando as variáveis agitação e temperatura, realizou-se a verificação dos modelos de primeira ordem, analisando as respostas concentração volumétrica e específica de carotenoides e biomassa em função das condições operacionais de processo.

Para a verificação do modelo, foram calculados os efeitos, desvio de padrão e limites de confiança apresentados no Apêndice 7. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

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 *R. glutinis*

	CVC ($\mu\text{g/L}$)				CEV ($\mu\text{g/g}$)				
	CR	EP	t (2)	p	CR	EP	t (3)	p	
Média*	415,01	5,55	74,81	<0,001	Média*	60,22	0,42	143,08	<0,001
X ₁ (L)*	-76,73	7,34	-10,46	0,009	X ₁ (L)*	-13,41	0,56	-24,09	<0,001
X ₂ (L)*	-261,21	7,34	-35,60	<0,001	X ₂ (L)*	-23,23	0,56	-41,72	<0,001
X ₁ ·X ₂ *	35,55	7,33	4,85	0,04	X ₁ ·X ₂ *	-3,83	0,56	-6,89	0,006

* ($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas, é possível observar na Tabela 13 que, para a produção volumétrica e específica de carotenoides, os coeficientes do modelo, como agitação, temperatura, bem como a interação de ambas, foram significativos ao nível de 95%. Dessa forma, foi realizado a análise de variância (ANOVA), apresentado na Tabela 14.

Tabela 14: Análise de variância para o delineamento composto central 2² para a levedura *R. glutinis*

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		Valor de p	
	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC
X ₁	23548,4	719,85	1	1	23548,4	719,85	<0,001	<0,001
X ₂	272917,4	2157,60	1	1	272917,4	2157,60	<0,001	<0,001
X ₁ ·X ₂	5055,9	58,83	1	1	5055,9	58,83	0,04	0,011
Regressão	301521,8	2936,28	3	3	100507,27	978,76		
Resíduo	1621,5	3,7	3	3	540,5	1,23		
Falta de ajuste	1190,7	2,37	1	1				
Erro puro	430,8	1,33	2	2				
Total	313643,3	2939,98	6	6				

X₁: Agitação (rpm) e X₂: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$). CVC= Concentração volumétrica de carotenoides e CEC= Concentração específica de carotenoides. CVC (R: 0,98, $F_{3;3; 0,95(\text{tabelado})} = 9,28$, $F_{\text{calculado}(\text{modelo})} = 185,95$) e CEC R: (0,99, $F_{3;3; 0,95(\text{tabelado})} = 9,28$, $F_{\text{calculado}(\text{modelo})} = 795,74$). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os coeficientes de correlação (R) 0,98 e 0,99 foram calculados na ANOVA (Tabela 14), sendo o mesmo valor para produção volumétrica e específica de carotenoides. Com isso, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão $F_{\text{calculado}}$ sobre F_{tabelado} foi 20,03 para a concentração volumétrica de carotenoides e 85,75 para concentração específica de carotenoides.

Dessa forma, foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas em função das variáveis agitação e temperatura nas faixas estudadas, mostradas nas Equações 2 e 3.

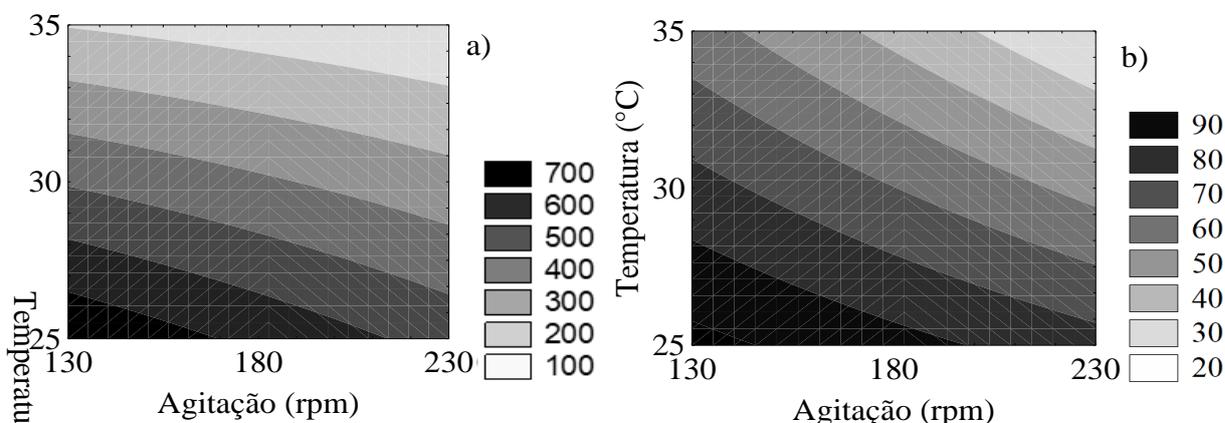
$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides } (\mu\text{g/L}) = 415,01 - 76,73 \cdot X_1 - 261,21 \cdot X_2 + 35,55 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Concentração específica de carotenoides } (\mu\text{g/g}) = 60,22 - 13,41 \cdot X_1 - 23,23 \cdot X_2 - 3,83 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: X_1 : Agitação; X_2 : Temperatura.

Dessa forma, as Equações 2 e 3 preveem bem o comportamento da concentração volumétrica e específica de carotenoides, frente às variáveis estudada. Através dos modelos, foi possível construir as curvas de contorno (Figura 4), obtendo-se as condições de processo agitação e temperatura para a máxima produção de carotenoides.

Figura 4: Curva de contorno para as respostas concentração volumétrica de carotenoides (a) e concentração específica de carotenoides (b) para a levedura *R. glutinis*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Com as curvas de contorno expostas nas Figuras 4 (a e b), verifica-se que para

obter uma maior concentração tanto volumétrica como específica de carotenoides deve-se trabalhar, no máximo com em agitação 130 rpm e temperatura 25 °C ou faixas inferiores. O aumento desses dois parâmetros não favorece o incremento na produção de carotenos, para a levedura *R. glutinis*

5.4.2. Efeito da condição de processo sobre as respostas concentração de carotenoides (volumétrica e específica) e de biomassa para a levedura *R. graminis*

Considerando as variáveis agitação e temperatura, realizou-se a verificação dos modelos de primeira ordem, analisando as respostas de concentração volumétrica e específica de carotenoides e biomassa em função das condições operacionais de processo.

Para a verificação do modelo, foram calculados os efeitos, desvio de padrão e limites de confiança apresentados no Apêndice 8. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

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 *R. graminis*

	CVC (µg/L)				CEV (µg/g)				
	CR	EP	t (2)	p	CR	EP	t (2)	p	
Média*	398,42	6,81	58,50	<0,001	Média*	84,78	1,13	74,71	<0,001
X ₁ (L)*	-122,97	9,01	-13,65	0,005	X ₁ (L)*	-23,62	1,50	-15,74	0,004
X ₂ (L)*	-123,69	9,01	13,26	0,005	X ₂ (L)*	20,33	1,50	13,54	0,005
X ₁ ·X ₂ *	-119,45	9,01	-13,26	0,005	X ₁ ·X ₂ *	-26,79	1,50	-17,84	0,003

* ($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os coeficientes de correlação (R) 0,77 e 0,64 foram calculados na ANOVA (Tabela 16), sendo semelhantes estes coeficientes para concentração volumétrica e específica em carotenoides. Além disso, o modelo se ajusta melhor aos dados experimentais da concentração volumétrica. A razão $F_{\text{calculado}}$ sobre F_{tabelado} foi 1,92 para a concentração volumétrica de carotenoides.

Tabela 16: Análise de variância para o delineamento composto central 2^2 para a levedura *R. graminis*

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		Valor de <i>p</i>	
	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC
X ₁	60484,0	2232,09	1	1	60484,0	2232,09	0,005	<0,001
X ₂	61194,4	1652,83	1	1	61194,4	1652,83	0,005	<0,001
X ₁ ·X ₂	57075,6	2871,35	1	1	57075,6	2871,35	0,04	0,011
Regressão	178754	6756,27	3	3	59584,67	2252,09		
Resíduo	120482,4	9981,73	3	3	40160,8	3327,24		
Falta de ajuste	119832,9	9963,70	1	1				
Erro puro	649,5	18,03	2	2				
Total	299236,4	16738,0	6	6				

X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEC = Concentração específica de carotenoides. CVC (R: 0,77, F_{3;3}; 0,95(tabelado) = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 1,48) e CEC (R: 0,64, F_{3;3}; 0,95(tabelado) = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 0,68). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Por outro lado, a concentração específica de carotenoides o F_{calculado} não foi maior que F_{tabelado}, entretanto como os fatores foram significativos ($p < 0,05$) é possível obter as equações de modelo, bem como a sua superfície. Dessa forma, as equações 4 e 5, descreve a respostas em função das variáveis agitação e temperatura nas faixas estudadas.

$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides } (\mu\text{g/L}) = 398,42 - 122,97 \cdot X_1 - 122,69 \cdot X_2 - 119,45 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 4})$$

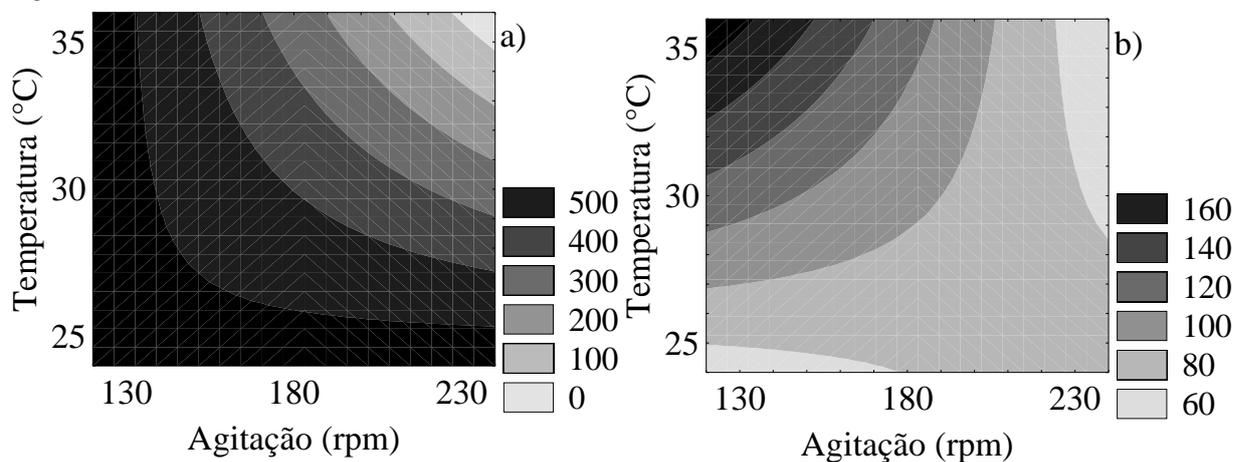
$$\text{Concentração específica de carotenoides } (\mu\text{g/g}) = 84,78 - 23,62 \cdot X_1 + 20,32 \cdot X_2 - 26,79 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde: X₁: Agitação; X₂: Temperatura.

Como o coeficiente de determinação (R²) do modelo é de 50,69%, ou seja, ele pode explicar pouco mais da metade da variação dos resultados. O modelo é significativo e possui repetibilidade, o valor de *p* para o modelo é menor do que 0,05.

Além disso, os fatores (X_1 , X_2) e a interação ($X_1.X_2$) também são significativas ao nível de confiança de 5%. Portanto, o modelo foi aceito para análise.

Figura 5: Curva de contorno para as respostas a concentração volumétrica de carotenoides (a) e a concentração específica de carotenoides (b) para a levedura *R. graminis*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para a levedura *R. graminis*, foi possível obter a superfície de contorno em relação ao *p*-valor obtido da Tabela de análise de variância.

Para ganho em termos de concentração volumétrica de carotenoides, não foi possível encontrar um ponto ótimo em relação a agitação e temperatura. O ponto ótimo deve estar a baixo de 25 °C e temperatura de 130 rpm. Por outro lado, para ganhos em termos da concentração específica verifica-se temperatura de 35 °C e agitação inferior a 130 rpm, analisando a Figura 5.

5.4.3. Efeito da condição de processo sobre as respostas concentração de carotenoides (volumétrica e específica) e biomassa para a levedura *R. aurantiaca*

Para a levedura *R. Aurantiaca*, não foi possível obter a superfície de contorno para a concentração específica de carotenoides em razão do valor do $F_{\text{calculado}}$ (1,38) ser menor que o valor do F_{tabelado} (9,28), além disso, o coeficiente de determinação (R^2) foi inferior a 35,53%, explicando menos da metade as variações dos resultados, não tendo uma boa repetibilidade, dessa forma não foi aceito para análise de variância (ANOVA).

Considerando as variáveis agitação e temperatura, realizou-se a verificação dos modelos de primeira ordem, analisando as respostas de concentração volumétrica de carotenoides e biomassa em função das condições operacionais de processo.

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 *R. aurantiaca*

	CVC ($\mu\text{g/L}$)				Biomassa (g/L)				
	CR	EP	t (2)	p	CR	EP	t (2)	p	
Média*	164,34	1,02	161,34	<0,001	Média*	3,84	0,22	175,97	<0,001
X ₁ (L)*	-16,23	1,35	-12,04	0,007	X ₁ (L)*	0,49	0,03	17,15	<0,001
X ₂ (L)*	-116,98	1,35	-86,81	<0,001	X ₂ (L)*	-0,98	0,03	-33,95	<0,001
X ₁ ·X ₂ *	-11,33	1,35	8,41	0,014	X ₁ ·X ₂ *	0,27	0,03	9,35	0,011

*($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C) e CVC = Concentração volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas, é possível observar na Tabela 17 que, tanto para a concentração volumétrica de carotenoides e biomassa, os coeficientes do modelo, como agitação e temperatura, bem como a interação agitação x temperatura, foram significativos ao nível de 95%. A Tabela 18 mostra o cálculo de Análise de Variância (ANOVA). Além disso, no apêndice 9 estão os efeitos, desvio de padrão e limites de confiança para biomassa e concentração volumétrica de carotenoides.

Tabela 18: Análise de variância para o delineamento composto central 2² para a levedura *R. aurantiaca*

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		Valor de p	
	CVC	Bio.	CVC	Bio.	CVC	Bio.	CVC	Bio.
X ₁	1053,65	0,98	1	1	1053,65	0,98	0,010	<0,001
X ₂	54732,60	3,84	1	1	54732,60	3,84	<0,001	<0,001
X ₁ ·X ₂	513,48	0,29	1	1	513,48	0,29	0,013	0,011
Regressão	56299,73	5,11	3	3	18766,58	1,70		
Resíduo	40983,53	0,82	3	3	13661,18	0,27		
Falta de ajuste	40969,0	0,81	1	1				

X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e Bio = Biomassa. CVC (R: 0,76, $F_{3;3; 0,95(\text{tabelado})} = 9,28$, $F_{\text{calculado}(\text{modelo})} = 1,37$) e Bio. (R: 0,93, $F_{3;3; 0,95(\text{tabelado})} = 9,28$, $F_{\text{calculado}(\text{modelo})} = 6,30$). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 18 Continuação: Análise de variância para o delineamento composto central 2² para a levedura *R. aurantiaca*

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		Valor de <i>p</i>	
	CVC	Bio.	CVC	Bio.	CVC	Bio.	CVC	Bio.
Erro puro	14,53	0,007	2	2				
Total	97283,26	5,93	6	6				

X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica em carotenoides e Bio = Biomassa. CVC (R: 0,76, F_{3;3; 0,95(tabelado)} = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 1,37) e Bio. (R: 0,93, F_{3;3; 0,95(tabelado)} = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 6,30). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Como os coeficientes de correção (R) foi de 0,76 e 0,93, ele pode explicar a variação dos resultados. O modelo é significativo e possui repetibilidade, o valor de *p* para o modelo é menor do que 0,05. Além disso, as variáveis (X₁, X₂) e a interação (X₁·X₂) também são significativas ao nível de confiança de 5%. Portanto, o modelo foi aceito para análise

Valores de R² acima de 58% e 86% para concentração volumétrica de carotenoides e biomassa respectivamente e as variáveis (X₁ e X₂) significativas (*p*<0,05) permitiram obter as equações para as respostas em função das variáveis agitação e temperatura, nas faixas estudadas, mostradas na Equação 6 e 7.

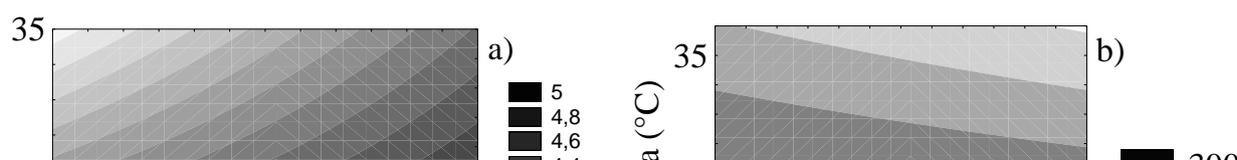
$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides } (\mu\text{g/L}) = 164,34 - 16,23 \cdot X_1 - 116,98 \cdot X_2 - 11,33 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\text{Crescimento celular (g/L)} = 3,84 + 0,50 \cdot X_1 - 0,98 \cdot X_2 + 0,27 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: X₁: Agitação; X₂: Temperatura

Para a biomassa, verifica-se que para obter elevada produção, deve-se trabalhar com agitação de 205 a 230 rpm, com temperatura de cultivo de 25 °C ou inferior. Já para ganhos na concentração volumétrica de carotenoides, não é possível de termina uma região ótima, podendo ser tanto 130 como 230 rpm, desde que a temperatura seja 25 °C, analisando a Figura 6.

Figura 6: Curva de contorno para as respostas crescimento celular (a) e concentração



volumétrica de carotenoides (b) para a levedura *R. aurantiaca*

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Ao sobrepor as duas superfícies da Figura 6 (a e b), pode-se obter uma região ótima que satisfaça as duas respostas (crescimento celular e produção de carotenoides), deve ser 205 a 230 rpm com temperatura de 25 °C, pode apresenta bons ganhos para as respostas, na faixa estuda do experimento.

5.4.4. Verificação dos modelos para as respostas concentração de carotenoides (volumétrica e específica) para a levedura *R. lactosa*

Considerando as variáveis agitação e temperatura, realizou-se a verificação dos modelos de primeira ordem analisando as respostas de concentração volumétrica e específica de carotenoides totais em função das condições operacionais de processo.

Para a verificação do modelo, foram calculados os efeitos, desvio padrão e limites de confiança apresentados no Apêndice 10. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentando nas Tabelas 19 e 20, respectivamente.

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 *R. lactosa*

	CVC ($\mu\text{g/L}$)					CEC ($\mu\text{g/g}$)			
	CR	EP	t (2)	p		CR	EP	t (2)	p
Média*	420,43	5,25	80,07	<0,001	Média*	97,62	1,28	76,52	<0,001
X ₁ (L)*	-41,21	6,95	-5,93	0,027	X ₁ (L)*	-12,31	1,69	-7,29	<0,001
X ₂ (L)*	-394,91	6,95	-56,85	<0,001	X ₂ (L)*	-72,77	1,69	-43,12	<0,001
X ₁ ·X ₂ *	36,83	6,95	5,30	0,007	X ₁ ·X ₂ *	8,76	1,69	5,19	0,035

*($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEC = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas, é possível observar na Tabela 19 que, tanto para a concentração volumétrica quanto específica de carotenoides, os coeficientes do modelo, como agitação e temperatura, bem como a interação agitação x temperatura, foram significativos ao nível de 95%. A Tabela 20 mostra o cálculo de Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 20: Análise de variância para o delineamento composto central 2² para a levedura *R. lactosa*

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		Valor de p	
	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC
X ₁	6792,20	6792,2	1	1	6792,20	6792,2	0,018	0,027
X ₂	623807,10	623807,7	1	1	623807,10	623807,7	<0,001	<0,001
X ₁ ·X ₂	5425,10	5425,1	1	1	5425,10	5425,1	0,035	0,033
Regressão	636025	22093,12	3	3	212008,33	7364,37		
Resíduo	403,50	109,66	3	3	134,50	36,55		
Falta de ajuste	17,5	86,88	1	1				
Erro puro	386,0	22,78	2	2				
Total	636428,50	22202,78	6	6				

X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEC = Concentração específica de carotenoides. PVC (R: 0,99, F_{3;3}; 0,95(tabelado) = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 1576,27) e PEC (R: 0,97, F_{3;3}; 0,95 = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 201,48). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os coeficientes de correlações (R) de 0,99 e 0,97 foram calculados na ANOVA (Tabela 20), respectivamente, para a concentração específica e volumétrica de carotenoides.

Com isso, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão $F_{\text{calculado}}$ sobre F_{tabelado} foi de 169,85 para a concentração volumétrica de carotenoides e 21,71 para a concentração específica de carotenoides.

Valores de R^2 acima de 62% e coerência no F teste permitiram que fossem obtidas equações para as respostas em função das variáveis agitação e temperatura, nas faixas estudadas, mostradas na Equação 8 e 9.

$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides } (\mu\text{g/L}) = 420,43 - 41,21 \cdot X_1 - 394,91 \cdot X_2 + 36,83 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq.8})$$

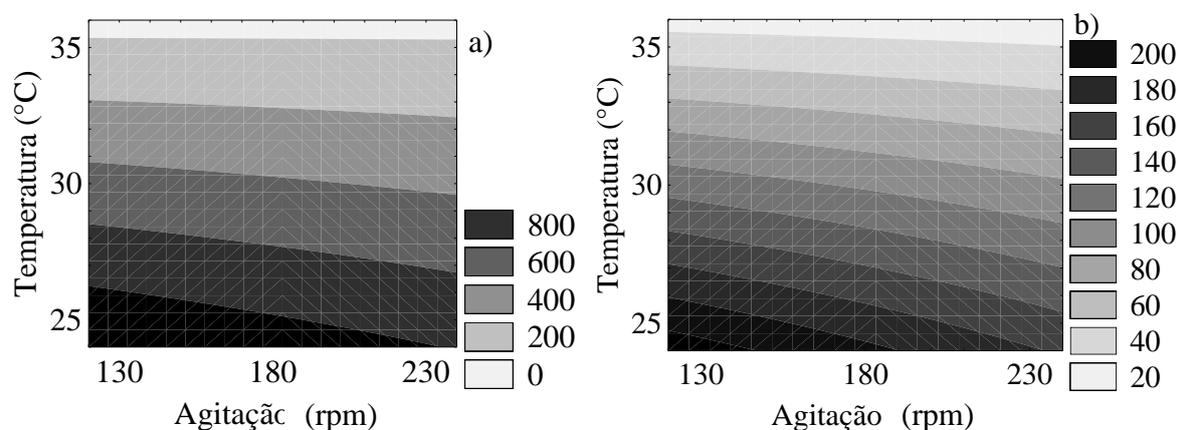
$$\text{Concentração específicos de carotenoides } (\mu\text{g/g}) = 97,62 - 12,31 \cdot X_1 - 72,76 \cdot X_2 + 8,76 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq.9})$$

Onde: X_1 : Agitação; X_2 : Temperatura.

Dessa forma, as Equações 8 e 9 preveem bem o comportamento da concentração volumétrica e específica de carotenoides, frente às variáveis estudadas.

Por meio dos modelos, tornou-se possível construir as curvas de contorno (Figura 7), podendo-se obter as seguintes condições de processo relacionando agitação e temperatura para a obtenção da máximas concentrações volumétricas e específicas de carotenoides.

Figura 7: Curva de contorno para as respostas concentração volumétrica de carotenoides (a) e concentração específica de carotenoides (b) para a levedura *R. lactosa*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Com as curvas de contorno expostas na Figura 7 (a e b), é possível verificar que

para obter elevada produção em biocorantes, a agitação e a temperatura devem ser inferiores à 130 rpm e 25 °C. Vale ressaltar que agitação e temperatura acima desse valor podem provocar inibição na síntese de carotenoides da levedura *R. lactosa*.

5.4.5. Verificação dos modelos para as respostas concentração de carotenoides (volumétrica e específica) para a levedura *R. mucilaginosa*

Considerando as variáveis agitação e temperatura, realizou-se a verificação dos modelos de primeira ordem analisando as respostas de concentração volumétrica e específica de carotenoides totais em função das condições operacionais de processo.

Para a verificação do modelo, foram calculados os efeitos, desvio padrão e limites de confiança, apresentados no Apêndice 11. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentados nas Tabelas 21 e 22, respectivamente.

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 *R. mucilaginosa*

	CVC (µg/L)					CEV (µg/g)			
	CR	EP	t (2)	p		CR	EP	t (2)	p
Média*	351,10	1,91	183,53	<0,001	Média*	55,84	0,28	198,81	<0,001
X ₁ (L)*	-77,59	2,53	-30,66	<0,001	X ₁ (L)*	-14,11	0,37	-37,98	<0,001
X ₂ (L)*	-230,06	2,53	-90,91	<0,001	X ₂ (L)*	-23,03	0,37	-61,98	<0,001
X ₁ ·X ₂ *	43,57	2,53	17,22	<0,001	X ₁ ·X ₂ *	-1,57	0,37	-4,22	0,037

*($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas, é possível observar na Tabela 21 que, para a concentração volumétrica e específica de carotenoides, os coeficientes do modelo, como agitação e temperatura, bem como a interação de ambas, foram significativos ao nível de 95%. Dessa forma, realizando a análise de variância (ANOVA), como mostra a Tabela 22.

Tabela 22: Análise de variância para o delineamento composto central 2² para a

levedura *R. mucilaginosa*

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		Valor de <i>p</i>	
	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC	CVC	CEC
X ₁	24080,80	796,65	1	1	24080,80	796,65	0,032	<0,001
X ₂	211710,40	2121,98	1	1	211710,40	2121,98	0,001	<0,001
X ₁ ·X ₂	7593,40	9,83	1	1	7593,40	9,83	0,124	0,038
Regressão	243384,7	2928,46	3	3	81128,23	976,15		
Resíduo	5061,8	2,33	3	3	1687,27	0,78		
Total	248446,5	2930,79	6	6				

X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEC = Concentração específica de carotenoides. PVC (R: 0,99, F_{3;3}; 0,95(tabelado) = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 48,08) e PEC (R: 0,99, F_{3;3}; 0,95(tabelado) = 9,28, F_{calculado(modelo)} = 1251,47). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os coeficientes de correlações (R) de 0,99 e 0,99 foram calculados na ANOVA (Tabela 22), respectivamente, para a concentração específica e volumétrica de carotenoides. Com isso, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão F_{calculado} sobre F_{tabelado} foi de 5,18 para a produção volumétrica de carotenoides e 134,86 para produção específica de carotenoides.

Valores de R² acima de 99% e coerência no F teste permitiram que fossem obtidas equações para as respostas em função das variáveis agitação e temperatura, nas faixas estudadas, mostradas na Equação 10 e 11.

$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides } (\mu\text{g/L}) = 351,10 - 77,59 \cdot X_1 - 230,06 \cdot X_2 + 43,57 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq.11})$$

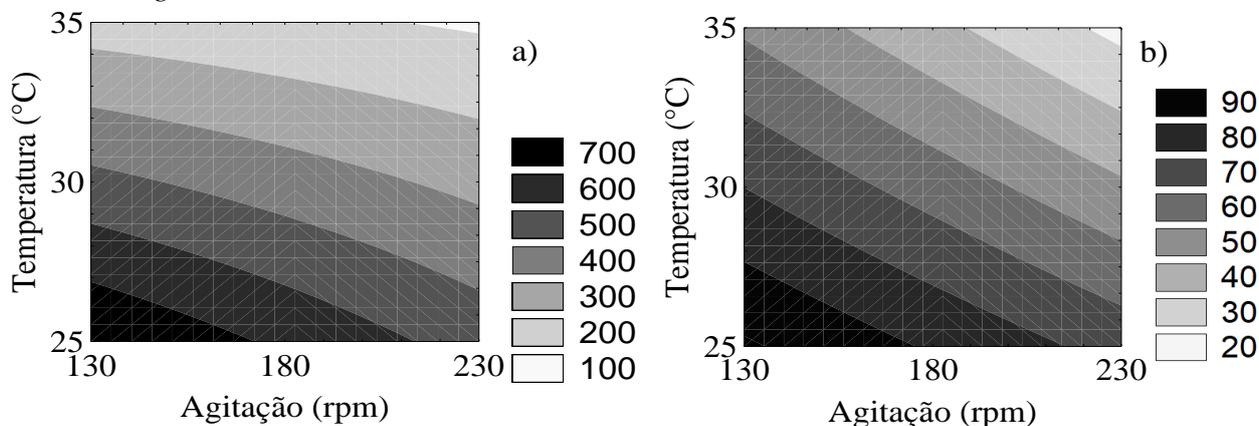
$$\text{Concentração específicas de carotenoides } (\mu\text{g/g}) = 55,84 - 14,11 \cdot X_1 - 23,03 \cdot X_2 - 1,57 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq.12})$$

Onde: X₁: Agitação; X₂: Temperatura

Por meio dos modelos, tornou-se possível construir as curvas de contorno (Figura 8), podendo-se obter as seguintes condições de processo relacionando agitação e temperatura para a obtenção da máxima concentração volumétrica e específica de

carotenoides.

Figura 8: Curva de contorno para as respostas concentração volumétrica de carotenoides (a) e concentração específica de carotenoides (b) para a levedura *R. mucilaginosa*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Com as curvas de contorno expostas na Figura 8 (a e b), é possível verificar que para obter elevada produção em biocorantes, a agitação e temperatura devem ser inferiores à 130 rpm e 25 °C. Vale ressaltar que agitação e temperatura acima desses valores podem provocar inibição na síntese de carotenoides da levedura *R. mucilaginosa*.

5.5. Seleção de fatores que compõem o meio de cultivo

Após a definição da condição ótima de processo em relação à agitação e temperatura para as leveduras (*R. glutinis*, *R. lactosa* e *R. mucilaginosa*), foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito das concentrações dos componentes do meio de bioprodução de carotenoides, que foram: concentração de extrato de levedura, de extrato de malte, de peptona e de glicose. As três respostas avaliadas foram os máximos valores alcançados na produção de biomassa, produção volumétrica e específica de carotenoides.

5.5.1. Planejamento fracionário 2^{5-1} : Seleção de fatores que compõem o meio de cultivo para levedura *R. glutinis*

O resultado do planejamento fatorial 2^{5-1} está apresentado na Tabela 23. Os resultados mostram que a concentração de carotenoides aumenta quando aumenta a

concentração de glicose, mas para a outra fonte de carbono, extrato de malte, não apresenta interferência na bioprodução. Por outro lado, quando se elevam as concentrações de extrato de levedura e de peptona, ocorre uma diminuição na obtenção dos pigmentos, em boa parte dos experimentos. Já o pH não apresenta interferência na faixa de 5 a 6, mas experimentos com pH 4 não apresentam uma boa produção de carotenos. Estes fatores independentes podem ser melhor observados individualmente na Figura 6, onde são apresentados os efeitos do aumento das concentrações das variáveis sobre as respostas, na faixa de estudo determinada.

Tabela 23: Planejamento fatorial 2^{5-1} (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para bioprodução de carotenoides para levedura *R. glutinis*

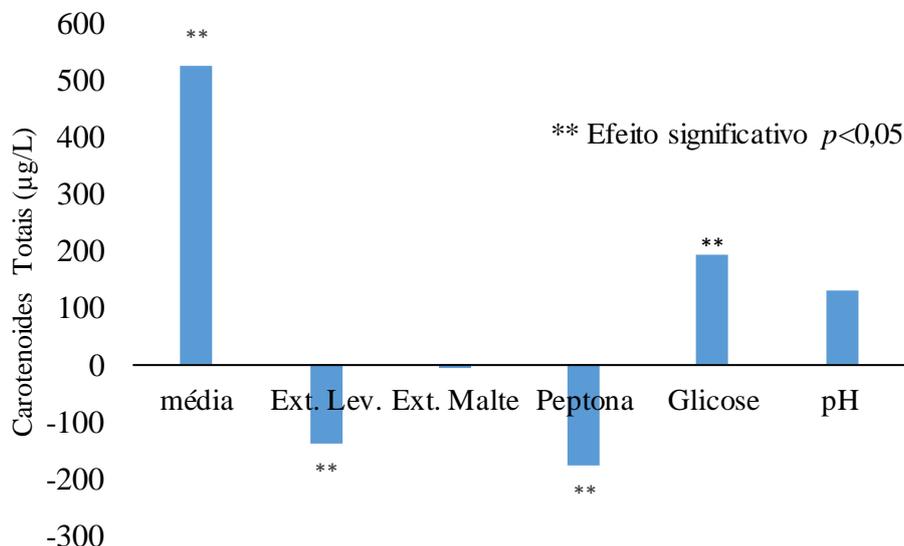
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	6 (+1)	6,09	74,66	758,26
2	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	4 (-1)	3,82	36,36	231,62
3	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	10 (-1)	4 (-1)	4,86	53,63	434,31
4	5 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	10 (-1)	6 (+1)	5,97	48,63	483,77
5	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	10 (-1)	4 (-1)	4,51	33,87	254,55
6	5 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	10 (-1)	6 (+1)	5,32	54,92	487,38
7	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	10 (-1)	6 (+1)	6,96	44,80	519,53
8	5 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	10 (-1)	4 (-1)	7,01	32,11	374,93
9	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	30 (+1)	4 (-1)	7,36	75,03	919,78
10	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	30 (+1)	6 (+1)	6,79	56,51	639,55
11	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	6 (+1)	9,38	59,69	933,67
12	5 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	4 (-1)	7,95	47,87	634,05
13	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	30 (+1)	6 (+1)	7,18	48,81	584,03
14	5 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	30 (+1)	4 (-1)	6,60	42,64	468,75
15	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	30 (+1)	4 (-1)	6,64	43,24	478,54
16	5 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	30 (+1)	6 (+1)	7,10	37,23	440,50
17	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	6,49	42,73	470,37
18	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	6,65	42,26	465,29
19	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	6,67	41,33	455,05

X₁ = Extrato de Levedura (g/L), X₂ = Extrato de Malte (g/L), X₃ = Peptona (g/L), X₄ = Glicose (g/L) e X₅ = pH. Y₁ = Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para a análise dos efeitos das variáveis foi avaliada sem as interações dos fatores, pois se trata de um planejamento fracionado, no qual são suportados os 15 fatores (5

variáveis independentes e suas 10 interações) um experimento contendo 17 ensaios.

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 *R. glutinis*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Observa-se que a glicose foi a única fonte de carbono com efeito positivo sobre a produção de carotenoides seguido do pH (efeito positivo). Este efeito estimulante da fonte de carbono pode ser explicado devido à facilidade da assimilação por via metabólica da glicose na biossíntese do β -caroteno. A glicose em associação com pH pode aumentar em até 45% uma bioprodução (CABRAL, 2011).

Embora o pH apresentou um efeito positivo, mas não significativo, ele é descrito como um regulador da produção de ácidos orgânicos no início do cultivo (MACHADO e BURKERT, 2015). O uso de um meio acidificado (pH inicial 4) provoca perturbação na rota metabólica, prejudicando a formação de ácido acético, álcool ou intermediários do ciclo do ácido cítrico durante a fase de adaptação. Estudos de produção de carotenoides pela *R. glutinis*, na faixa de pH 3 a 8, demonstram que pH 6,5 é mais favorável para a produção de pigmentos por induzir a taxa de crescimento celular e a produção de carotenoide (AKSU e EREN, 2007).

Já a concentração de extrato de levedura e peptona apresentou um efeito negativo na produção. Embora a fonte de nitrogênio usada nesse trabalho seja conhecida por promover um crescimento celular satisfatório, sua alta concentração no meio de cultivo pode suprimir a biossíntese de carotenoides e outros metabolitos secundários,

como os lipídeos (SAENGE et al., 2011). Alguns pesquisadores relatam que a relação C:N influencia a produção de corantes em vários micro-organismos (BRAUNWALD et al., 2013; MACHADO e BURKERT, 2015, TKÁČOVÁ et al., 2017). Quantidades mínimas de nitrogênio podem ser utilizadas para a manutenção do desenvolvimento celular, enquanto que o excesso de carbono no meio de cultivo é utilizado na síntese de carotenos, fato observado nesse trabalho, pela levedura *R. glutinis*, que necessita de quantidades menores de nitrogênio.

Portanto, para a maximização da bioprodução de carotenoides, foram modificados os níveis de estudo para menores valores na concentração de extrato de levedura e de peptona, deslocando a faixa para 0 a 2 g/L, região próxima ao ponto central da Tabela 23. Por outro lado, a glicose teve um efeito positivo significativo ($p < 0,05$). Assim, o seu nível foi deslocado para valores mais altos (30 a 50 g/L).

Considerando que o pH é uma variável não controlada ao longo do cultivo foi visto na Tabela 23, que boa parte dos experimentos com pH inicial de 4 não apresenta bons resultados para concentração volumétrica de carotenoides, por outro lado valores de 5 a 6 são mais favoráveis para produção de corantes, e como efeito foi positivo, mas não significativo ($p > 0,05$), ele foi fixado em 6 por apresentar bons resultados nessa faixa de estudo. Já o extrato de malte apresentou pouca influência e foi fixado em seu nível mais baixo (1 g/L). Em resumo, a estratégia tomada foi aumentar a relação C:N e reduzir as fontes de nitrogênio para melhor absorver o excesso das fontes de carbono disponíveis no meio de cultivo (TASKIN et al., 2016 e SPIER et al., 2015).

5.5.2. Planejamento fracionário 2^{5-1} : Seleção de fatores que compõem o meio de cultivo para a levedura *R. lactosa*

Na Tabela 24, estão apresentados os resultados do planejamento 2^{5-1} . Percebe-se que no ensaio 9, com a redução das componentes do meio de cultivo em associação com nível mais alto de glicose, a produção de carotenoides é estimulada. Entretanto, isso não ocorre para a segunda fonte de carbono (extrato de malte), quando os parâmetros independentes são trabalhados em níveis inferiores. Já o pH não apresenta interferência na faixa de 5 a 6, mas experimentos com pH 4 não apresentam uma boa produção de carotenos (exceção do ensaio 9).

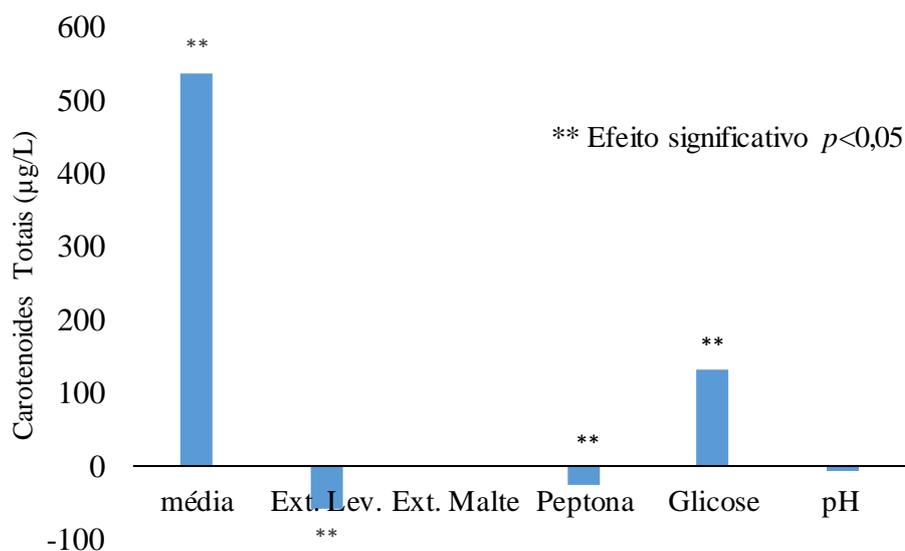
Tabela 24: Planejamento fatorial 2^{5-1} (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para bioprodução em carotenoides para a levedura *R. lactosa*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	6 (+1)	4,05	113,06	457,99
2	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	4 (-1)	3,33	93,14	310,46
3	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	10 (-1)	4 (-1)	4,61	39,87	184
4	5 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	10 (-1)	6 (+1)	6,43	84,81	545,5
5	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	10 (-1)	4 (-1)	3,54	97,71	345,65
6	5 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	10 (-1)	6 (+1)	4,29	106,84	458,31
7	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	10 (-1)	6 (+1)	7,16	75,98	543,7
8	5 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	10 (-1)	4 (-1)	7,83	53	415,2
9	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	30 (+1)	4 (-1)	8,55	119,31	1019,84
10	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	30 (+1)	6 (+1)	6,94	73,56	510,66
11	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	6 (+1)	9,11	48,61	442,72
12	5 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	4 (-1)	6,96	60,96	424,49
13	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	30 (+1)	6 (+1)	3,83	78,84	302,2
14	5 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	30 (+1)	4 (-1)	6,55	59,52	389,92
15	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	30 (+1)	4 (-1)	8,45	86,61	731,5
16	5 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	30 (+1)	6 (+1)	8,86	56,44	500,28
17	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	6,69	130,18	865,13
18	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	6,63	128,8	862,1
19	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	6,61	131,55	880,52

X₁ = Extrato de Levedura (g/L), X₂ = Extrato de Malte (g/L), X₃ = Peptona (g/L), X₄ = Glicose (g/L) e X₅ = pH. Y₁ = Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Estes fatores independentes podem ser melhor observados individualmente na Figura 10, onde são apresentados os efeitos do aumento das concentrações das variáveis sobre as respostas, na faixa de estudo determinada. As análises dos efeitos das variáveis foram avaliadas sem as interações dos fatores, pois se trata de um planejamento fracionado, no qual são suportados os 15 fatores (5 variáveis independentes e suas 10 interações) em um experimento contendo 17 ensaios.

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 *R. lactosa*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

O acúmulo de carotenoides em micro-organismos pigmentados depende altamente das condições de cultivo tais como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, e relação molar C/N e pH inicial (MACHADO e BURKERT, 2015; SPIER et al., 2015; AKSU e EREN, 2007). Particularmente, a glicose tem um efeito estimulante na taxa de crescimento celular. Altos níveis de glicose em associação a baixa concentração de fontes de nitrogênio favorecem a produção de corante, como é constatada na Tabela 24.

Por outro lado, há vários relatos que o gênero de levedura *Rhodotorula* é descrito por se adaptar em diferentes fontes de carbono (OBRUCA et al, 2015; SCHNEIDER et al., 2013). Nesse trabalho, verificou-se que o extrato de malte não apresenta efeito sobre a produção de corante (Figura 10). Em um cultivo misto de açúcares, a glicose se liga mais facilmente ao sítio de ligação alostérico da enzima presente na levedura, ocorrendo primeiro o consumo desse carboidrato simples para então consumir o açúcar complexo (extrato de malte). Cheng et al. (2016) investigaram o perfil de consumo da *R. mucilaginosa* em diferentes fontes alternativas de açúcares, nas quais a glicose é esgotada nas primeiras horas, por ser um açúcar simples de fácil metabolização, para depois a sacarose ou xilose, açúcares complexo, serem consumidos.

O extrato de levedura e a peptona são descritos como excelentes fontes de nitrogênio para obtenção de diferentes bioprodutos. Nesse trabalho, foi constatado que as duas fontes de nitrogênio apresentaram efeito significativo, mas negativo. Dessa forma, uma quantidade baixa dessas fontes pode beneficiar a produção de corantes, ou

seja, uma relação C/N alta (TKÁČOVÁ et al., 2017; MACHADO e BURKERT, 2015; BRAUNWALD et al., 2013).

Embora o pH não tenha apresentado efeito sobre a produção nesse trabalho, alguns pesquisadores relatam que ele influencia a síntese de carotenoides, estimulando o crescimento celular entre a faixa 3 a 4, mas o conteúdo de carotenoides é mais baixo. Por outro lado, faixas de pH 5 a 7 podem beneficiar tanto a multiplicação celular como o conteúdo total de caroteno (CHENG et al., 2016; LUO et al., 2013).

Por fim, percebe-se que a *Rhodotorula lactosa* necessita de pequenas quantidades de fontes de nitrogênio para sua manutenção e alta quantidade de fonte de carbono (glicose) para síntese de corante.

5.5.3. Planejamento fracionário 2^{5-1} : Seleção de fatores que compõe o meio de cultivo para a levedura *R. mucilaginosa*

Os resultados do planejamento fatorial 2^{5-1} estão apresentados na Tabela 25. Os resultados mostram que a concentração de carotenoides totais diminui quando a concentração de extrato de levedura e peptona aumenta na maioria dos experimentos e que os ensaios com pH 6 podem favorecer a bioprodução. Por outro lado, quando uma das fontes de nitrogênio é baixa (extrato de levedura ou peptona) e o pH é 4, a bioprodução é baixa na maioria dos experimentos. Esses fatores independentes podem ser observados individualmente na Figura 11, onde são apresentados os efeitos do aumento das concentrações das variáveis nas respostas na faixa de estudo determinada.

Tabela 25: Planejamento fatorial 2^{5-1} (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para bioprodução em carotenoides para a levedura *R. mucilaginosa*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	6 (+1)	7,25	252,53	1831,41
2	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	4 (-1)	10,05	261,41	2627,77
3	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	10 (-1)	4 (-1)	13,50	225,30	3042,46
4	5 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	10 (-1)	6 (+1)	12,93	237,52	3070,13
5	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	10 (-1)	4 (-1)	10,33	281,94	2912,77
6	5 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	10 (-1)	6 (+1)	8,53	239,41	2041,86

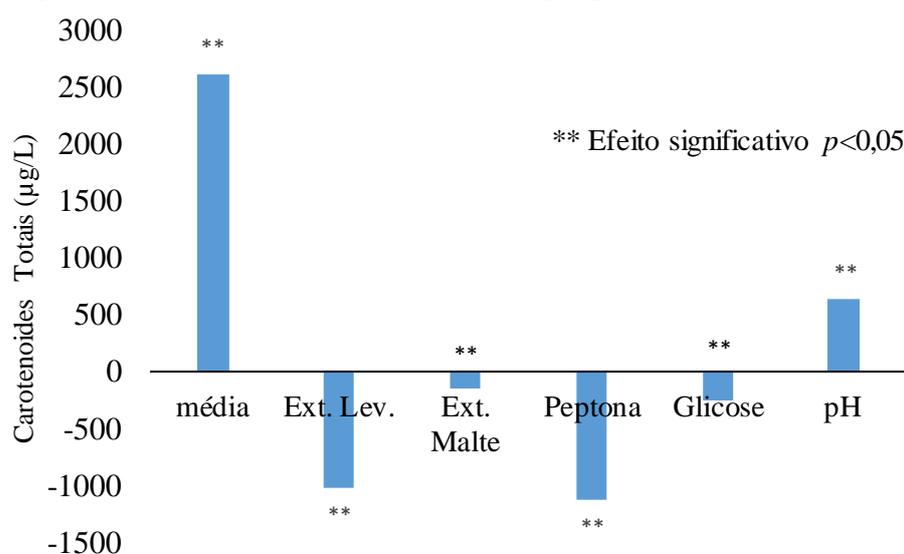
X₁ = Extrato de Levedura (g/L), X₂ = Extrato de Malte (g/L), X₃ = Peptona (g/L), X₄ = Glicose (g/L) e X₅ = pH. Y₁ = Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

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 *R. mucilaginosa*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y ₁	Y ₂	Y ₃
7	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	10 (-1)	6 (+1)	13,67	249,08	3404,39
8	5 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	10 (-1)	4 (-1)	13,47	172,62	2325,51
9	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	30 (+1)	4 (-1)	17,51	262,52	4891,13
10	5 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	30 (+1)	6 (+1)	17,79	198,80	3535,81
11	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	6 (+1)	18,81	261,96	5099,55
12	5 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	4 (-1)	16,66	36,59	609,57
13	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	30 (+1)	6 (+1)	13,60	178,57	2428,92
14	5 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	30 (+1)	4 (-1)	17,87	30,51	545,10
15	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	30 (+1)	4 (-1)	16,36	42,60	696,97
16	5 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	30 (+1)	6 (+1)	20,05	66,43	1332,22
17	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	16,14	190,52	3081,57
18	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	16,21	186,79	3021,27
19	3 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	20 (0)	5 (0)	16,17	194,25	3141,88

X₁ = Extrato de Levedura (g/L), X₂ = Extrato de Malte (g/L), X₃ = Peptona (g/L), X₄ = Glicose (g/L) e X₅ = pH. Y₁ = Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

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 *R. mucilaginosa*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Observa-se que o extrato de levedura e a peptona foram as variáveis de maior

influência com um efeito negativo na concentração de carotenoides, seguido de pH (efeito positivo). Este efeito inibitório do extrato de levedura e da peptona pode ser explicado por uma fonte excessiva de nitrogênio ou uma baixa relação C:N que reduz o acúmulo de carotenoides em microrganismos pigmentados, incluindo as cepas *Rhodotorula* (TASKING et al., 2016). Os microrganismos produtores de carotenoides requerem quantidades mínimas de nitrogênio, servindo como manutenção para o seu desenvolvimento, permitindo que o excesso de carbono no meio de cultura seja utilizado na síntese de pigmentos (SPIERO et al., 2015), fato observado neste trabalho para *R. mucilaginosa*, que requer quantidades menores de nitrogênio.

Para leveduras produtoras de biopigmentos, no início do cultivo, tudo indica que ocorreu uma produção de ácidos orgânicos e depois a assimilação destes ácidos. O uso de meios de cultura acidificados (pH inicial 4) provoca uma desordem na via metabólica, prejudicando a formação de intermediários de ácido acético, álcool ou ácido cítrico durante a fase de adaptação (MACHADO e BURKERT, 2015).

Um meio de cultivo muito ácido (pH 3) ou alcalino (pH 8) nessas regiões não favorecem o gênero de levedura de *Rhodotorula*, embora o pH na faixa de 5,0 a 6,5 aumente a produção de pigmento induzindo o crescimento celular e a taxa de produção de carotenoides (CUTZU et al., 2013).

Portanto, para maximizar a bioprodução dos carotenoides, os níveis de concentração de extrato de levedura foram modificados para valores mais baixos, deslocando o intervalo para 0,5 a 3,5 g/L e peptona de 1 a 5 g/L, uma região próxima ao ponto central da Tabela 25. Como o pH teve um efeito positivo significativo ($p < 0,05$), seus níveis foram transferidos para valores mais altos (5,5 para 7,5). Considerando que as demais variáveis foram significativas, como extrato de malte (10 g/L) e glicose (30 g/L) e exerceram pouca influência na concentração de carotenoides e, portanto, foram fixadas em seu nível mais alto (+1). Em suma, a estratégia adotada foi reduzir as fontes de nitrogênio para absorver melhor o excesso de fontes de carbono disponíveis no meio de cultura (TASKING et al., 2016; SPIERO et al., 2015).

5.6. Planejamento fatorial completo 2^3

Um planejamento experimental completo 2^3 foi realizado para avaliar o efeito das concentrações das variáveis encontradas para cada levedura (*R. glutinis*, *R. lactosa* e *R. mucilaginosa*) relativas aos itens 5.4.1 ao 5.4.3. As respostas avaliadas foram a

máxima concentração volumétrica e específica de carotenoides.

5.6.1 Planejamento fatorial completo 2^3 para a levedura *R. glutinis*

A Tabela 23 apresenta os valores reais e codificados para o delineamento composto central rotacional 2^3 (DCCR) e suas respostas em termos do crescimento celular, concentração específica e volumétrica de carotenoides. Observa-se na Tabela 26 que as maiores concentrações de carotenoides foram obtidas na região do maior nível de fonte de carbono seguida na de baixos níveis de fontes de nitrogênio, caracterizando uma alta relação C:N.

Tabela 26: Delineamento composto central 2^3 (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura *R. glutinis*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	0,40 (-1)	0,40 (-1)	34,05 (-1)	9,24	75,04	693,69
2	1,60 (+1)	0,40 (-1)	34,05 (-1)	10,68	105,86	1130,83
3	0,40 (-1)	1,60 (+1)	34,05 (-1)	10,03	104,70	1049,76
4	1,60 (+1)	1,60 (+1)	34,05 (-1)	9,54	98,53	939,81
5	0,40 (-1)	0,40 (-1)	45,95 (+1)	10,49	103,48	1085,19
6	1,60 (+1)	0,40 (-1)	45,95 (+1)	12,61	106,43	1342,54
7	0,40 (-1)	1,60 (+1)	45,95 (+1)	12,83	105,17	1349,54
8	1,60 (+1)	1,60 (+1)	45,95 (+1)	5,36	106,71	572,05
9	0 (-1,68)	1 (0)	40 (0)	9,24	108,39	1002,00
10	2 (+1,68)	1 (0)	40 (0)	7,59	73,61	559,03
11	1 (0)	0 (-1,68)	40 (0)	10,53	97,85	1029,97
12	1 (0)	2 (+1,68)	40 (0)	11,28	110,16	1242,48
13	1 (0)	1 (0)	30 (-1,68)	9,17	104,86	961,77
14	1 (0)	1 (0)	50 (+1,68)	11,89	96,15	1143,60
15	1 (0)	1 (0)	40 (0)	12,31	101,31	1215,82
16	1 (0)	1 (0)	40 (0)	10,68	110,67	1328,19
17	1 (0)	1 (0)	40 (0)	11,69	104,77	1257,39

X₁ = Extrato de levedura (g/L), X₂ = Peptona (g/L) e X₃ = Glicose. Extrato de malte em 1 g/L e pH inicial 6. Y₁= Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

No DCCR (Tabela 26), a máxima produção de carotenoides variou de 559,03 µg/L (ensaio 10) a 1349,54 µg/L (ensaio 7) e a concentração de biomassa de 5,36 g/L (ensaio 8) a 12,83 g/L (ensaio 7), em 144 h. Com o planejamento, a máxima

concentração de carotenoides foi aumentada em 121,31% e biomassa em 45,45%, quando comparada às condições iniciais de processo (Tabela 7).

Observando a Tabela 27, é possível perceber que as variáveis extrato de levedura e glicose dos coeficientes de regressão obtidos foram estatisticamente significativos a 90% de confiança, tanto que somente a peptona não foi significativa. Por outro lado, todas as interações foram significativas. Sendo assim, os coeficientes que não apresentaram significância ($p < 0,1$) foram incorporados à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA que está apresentada na Tabela 28.

Tabela 27: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica de carotenoides para a levedura *R. glutinis*

	CVC ($\mu\text{g/L}$)			
	CR	EP	t (2)	p
Média*	1263,93	32,73	38,61	<0,001
X ₁ (L)*	-68,68	15,38	-4,47	0,04
X ₁ (Q)*	-151,19	16,94	-9,54	0,01
X ₃ (L)*	61,61	15,38	4,01	0,05
X ₃ (Q)*	-54,76	16,94	-3,85	0,06
X ₁ xX ₂ *	-197,74	20,09	-9,84	0,01
X ₁ xX ₃ *	-105,92	20,09	-5,27	0,03
X ₂ xX ₃ *	-83,90	20,09	-4,18	0,05

*($p < 0,1$), X₁: Extrato de Levedura (g/L), X₂: Peptona (g/L) e X₃: Glicose (g/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018

Os efeitos das três variáveis independentes (extrato de levedura, peptona e glicose) foram calculados, bem como o desvio padrão e os limites de confiança estão apresentados no Apêndice 12, para as respostas crescimento celular e concentração volumétrica e específica de carotenoides.

A equação 13 apresenta o modelo de segunda ordem codificado, que descreve a concentração de carotenoides, em função das variáveis independentes (extrato de levedura, peptona e glicose), dentro do intervalo estudado. O modelo foi validado através da análise de variância (Tabela 28). O coeficiente de correção de 0,85 e $F_{\text{calculado}}$ de 2,37 vezes maior que o valor tabelado para carotenoides totais permitiram a construção da curva de contorno apresentada na Figura 9.

$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides (}\mu\text{g/L)} = 1263,93 - 68,68 \cdot X_1 - 138,739 \cdot X_1^2 + 61,61 \cdot X_3 - 54,76 \cdot X_3^2 - 197,74 \cdot X_1 \cdot X_2 - 105,92 \cdot X_1 \cdot X_3 - 83,90 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 13})$$

Onde X_1 = extrato de levedura; X_2 = peptona e X_3 = glicose.

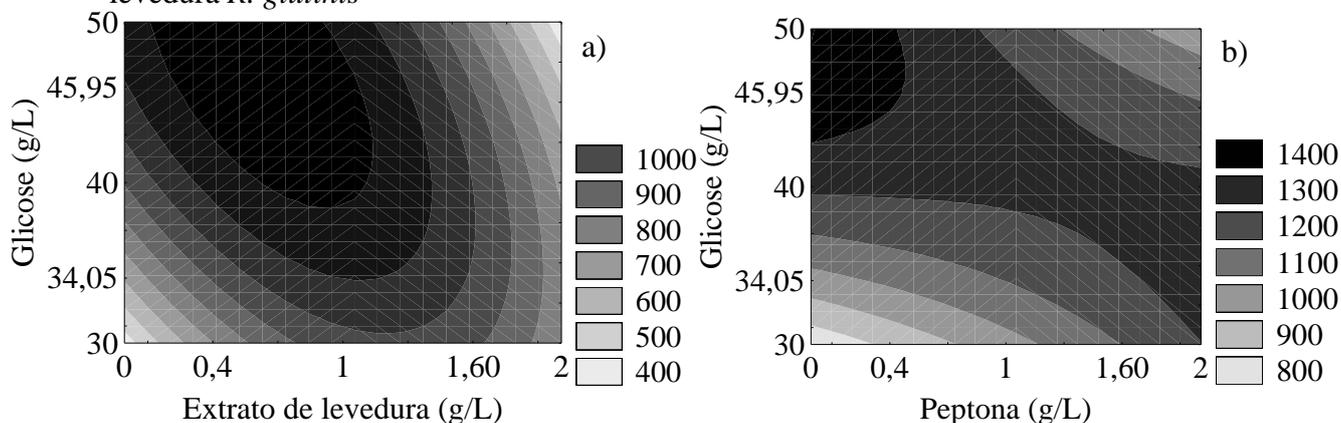
Tabela 28: Análise de variância para o delineamento composto central 2^3 para a levedura *R. glutinis*

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de p
Fonte de variação	CVC	CVC	CVC	CVC
X_1 (L)*	64363,8	1	64363,8	0,047
X_1 (Q)*	249848,5	1	249848,5	0,013
$X_1 \cdot X_2$ *	312812,8	1	312812,8	0,010
$X_1 \cdot X_3$ *	89746,0	1	89746,0	0,034
$X_2 \cdot X_3$ *	56312,0	1	56312,0	0,052
Regressão	861792,1	7	123113,16	
Resíduo	133896,5	9	14877,39	
Falta de ajuste	127440,6	7		
Erro puro	6455,9	2		
Total	995688,6	16		

*($p < 0,1$), X_1 : Extrato de Levedura (g/L), X_2 : Peptona (g/L) e X_3 : Glicose (g/L). CVC= Concentração volumétrica em carotenoides. CVC (R: 0,85, $F_{7;9}$: 0,90(tabelado) = 2,51, $F_{\text{calculado(modelo)}} = 8,28$). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Através dos modelos foi possível construir as curvas de contorno (Figuras 12) tornando possível realizar a previsão sobre a condição ideal para cultivar a levedura *R. glutinis*.

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 *R. glutinis*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

As curvas de contorno foram obtidas através dos modelos de segunda ordem. Ao sobrepor as duas figuras, é possível obter uma região ótima que favoreça os parâmetros estudados. Para obter a máxima concentração de carotenoides (Figura 12), o meio de cultivo deve conter 0,2 a 1,2 g/L de extrato de levedura, 0 a 0,4 g/L de peptona, 45,95 a 50 g/L de glicose, 1 g/L de extrato de malte, 0,2 g/L de KNO₃, 6,0 pH inicial, 130 rpm e 25 °C.

Portanto, após análise da Figura 12 e com o objetivo da validação do modelo otimizado para produção de carotenoides pela *Rhodotorula glutinis*, foi selecionado o meio de produção ótimo para satisfazer os três parâmetros estudados, sendo necessários 0,4 g/L de peptona (nível -1), 0,7 g/L de extrato de levedura (nível -0,5), 45,95 g/L de glicose (nível +1), 1 g/L de extrato de malte, 0,2 g/L de KNO₃ com pH inicial de 6,0 a 130 rpm e com 25 °C, para uma máxima produção em corantes.

5.6.2. Planejamento fatorial completo 2³ para a levedura *R. lactosa*

Os resultados do planejamento (Tabela 29) indicaram que houve uma variação da produção de corante nas 17 corridas na faixa entre 451,58 a 1387,63 µg/L. O mesmo ocorreu para a concentração específica de carotenoides entre 73,61 a 147,36 µg/g em 144 h. Com o planejamento, a máxima concentração de carotenoides foi aumentada em 60% e a biomassa em 44%, quando comparada às condições iniciais de processo (Tabela 5).

Observa-se na Tabela 29 que as maiores concentrações de carotenoides foram estimulados com aumento da concentração de glicose e menores concentração de fonte de nitrogênio, em boa parte dos experimentos.

Tabela 29: Delineamento composto central 2³ (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura *R. lactosa*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	0,40 (-1)	0,40 (-1)	34 (-1)	7,70	147,19	1133,26
2	1,60 (+1)	0,40 (-1)	34 (-1)	8,37	73,61	615,83
3	0,40 (-1)	1,60 (+1)	34 (-1)	8,84	81,95	724,25
4	1,60 (+1)	1,60 (+1)	34 (-1)	10,28	86,02	920,08
5	0,40 (-1)	0,40 (-1)	45,95 (+1)	8,32	147,18	1223,91

X₁ = Extrato de levedura (g/L), X₂ = Peptona (g/L) e X₃ = Glicose. Extrato de malte em 1 g/L e pH inicial 5. Y₁ = Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 29 Continuação: Delineamento composto central 2^3 (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura *R. lactosa*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
6	1,60 (+1)	0,40 (-1)	45,95 (+1)	8,47	91,05	771,17
7	0,40 (-1)	1,60 (+1)	45,95 (+1)	9,03	108,1	975,84
8	1,60 (+1)	1,60 (+1)	45,95 (+1)	10,31	114,35	1178,51
9	0 (-1,68)	1 (0)	40 (0)	9,42	147,36	1387,63
10	2 (+1,68)	1 (0)	40 (0)	5,55	81,31	451,58
11	1 (0)	0 (-1,68)	40 (0)	10,72	122,31	1310,8
12	1 (0)	2 (+1,68)	40 (0)	8,78	114,59	1006,59
13	1 (0)	1 (0)	30 (-1,68)	9,25	99,40	919,21
14	1 (0)	1 (0)	50 (+1,68)	8,01	144,69	1159,66
15	1 (0)	1 (0)	40 (0)	9,33	123,59	1174,82
16	1 (0)	1 (0)	40 (0)	8,97	131,22	1214,97
17	1 (0)	1 (0)	40 (0)	9,47	129,54	1199,41

X₁ = Extrato de levedura (g/L), X₂ = Peptona (g/L) e X₃ = Glicose. Extrato de malte em 1 g/L e pH inicial 5. Y₁= Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Os efeitos das três variáveis independentes (extrato de levedura, peptona e glicose) foram calculados, bem como o desvio padrão e os limites de confiança estão apresentados no Apêndice 13 para as respostas biomassa e concentração volumétrica e específica de carotenoides.

É observado, pela Tabela 30, que os termos independentes do cultivo (extrato de levedura, peptona e glicose) obtidos do planejamento fatorial foram todos significativos ($p < 0,05$) a 95% de confiança, tanto para concentração volumétrica como específica de carotenoides. Por outro lado, a interação extrato de levedura e glicose não foi significativa para concentração volumétrica, já para a concentração específica a interação peptona e glicose bem como extrato de levedura e glicose não foram significativos. Sendo assim, os coeficientes que não apresentaram significância ($p < 0,05$) foram incorporados à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA que está apresentada na Tabela 31.

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 *R. lactosa*

	CVC ($\mu\text{g/L}$)				CEV ($\mu\text{g/g}$)				
	CR	EP	t (2)	p	CR	EP	t (2)	p	
Média*	1202,17	11,66	103,07	<0,001	Média*	128,88	2,30	55,80	<0,001
X ₁ (L)*	-157,15	5,48	-28,68	<0,001	X ₁ (L)*	-16,88	1,09	-15,55	<0,001
X ₁ (Q)*	-117,37	6,03	-19,44	<0,001	X ₁ (Q)*	-7,44	1,96	-6,23	0,020
X ₂ (L)*	-33,46	5,48	-6,11	0,030	X ₂ (L)*	-5,98	1,09	-5,51	0,030
X ₂ (Q)*	-32,66	6,04	-5,41	0,030	X ₂ (Q)*	-5,99	1,20	-5,00	0,030
X ₃ (L)*	85,01	5,48	15,51	<0,001	X ₃ (L)*	10,85	1,08	9,99	<0,001
X ₃ (Q)*	-74,91	6,04	-12,41	<0,001	X ₃ (Q)*	-4,71	1,20	-3,94	0,050
X ₁ xX ₂ *	171,08	7,16	23,90	<0,001	X ₁ xX ₂ *	17,50	1,42	12,35	<0,001
X ₂ xX ₃ *	33,00	7,16	4,61	0,040					

*($p < 0,05$), X₁: Extrato de Levedura (g/L), X₂: Peptona (g/L), X₃: Glicose (g/L), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides.

Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 31: Análise de variância para o delineamento composto central 2^3 para a levedura *R. lactosa*

		Fonte de	Soma	Graus de	Média	Valor de p			Fonte de	Soma	Graus de	Média	Valor de p
		variação	Quadrática	liberdade	quadrática				variação	Quadrática	liberdade	quadrática	
Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L)	X ₁ (L)		336959	1	336959	0,001			X ₁ (L)	3888,88	1	3888,88	0,004
	X ₁ (Q)		154874	1	154874	0,002			X ₁ (Q)	622,90	1	622,90	0,025
	X ₂ (L)		15277	1	15277	0,026			X ₂ (L)	487,75	1	487,75	0,031
	X ₂ (Q)		11991	1	11991	0,032			X ₂ (Q)	402,78	1	402,78	0,037
	X ₃ (L)		98611	1	98611	0,041			X ₃ (L)	1605,24	1	1605,24	0,010
	X ₃ (Q)		63093	1	63093	0,006			X ₃ (Q)	249,60	1	249,60	0,058
	X ₁ ·X ₂		234157	1	234157	0,002			X ₁ ·X ₂	2451,05	1	2451,05	0,006
	X ₂ ·X ₃		8714	1	8714	0,044			Regressão	9268,73	7	1324,10	12,27
	Regressão		870235	8	108779,38	4,33			Resíduo	971,03	9	107,89	
	Resíduo		200759	8	25094,88				Falta de ajuste	938,88	7		
Falta de ajuste		199939	6					Erro puro	32,15	2			
Erro puro		820	2					Total	10239,76	16			
Total		1070994	16										

X₁: Extrato de Levedura (g/L), X₂: Peptona (g/L) e X₃: Glicose (g/L). Concentração volumétrica de carotenoides (R: 0,90, F_{7;9; 0,95} = 3,29, F_{calculado(modelo)} = 4,33) e Concentração específica de carotenoides (R: 0,90, F_{6;10; 0,95(tabelado)} = 3,22, F_{calculado(modelo)} = 12,27). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

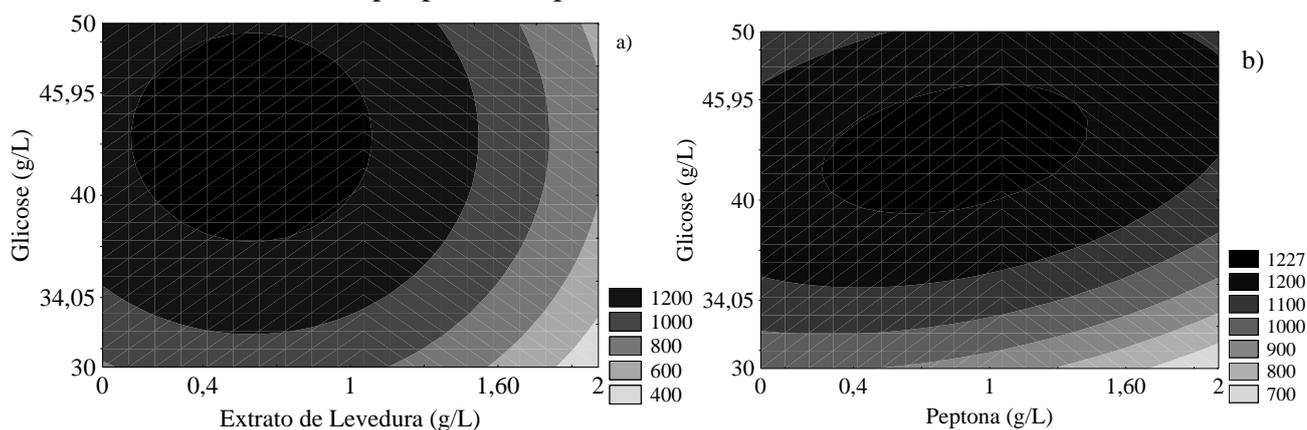
As equações regressivas (14 e 15) são as respostas para concentração volumétrica e específica de carotenoides expressas em valores codificados (X_1 , X_2 e X_3) e os coeficientes numéricos da equação empírica são obtidos da Tabela 30. O modelo foi validado através da análise de variância (Tabela 31). O coeficiente de correção de 0,85, significa uma excelente correlação entre as variáveis independentes. Além disso, a razão $F_{\text{calculado}}$ pelo F_{tabelado} foi de 1,26 e 3,82 para concentração volumétricos e específicos de carotenoides, respectivamente, satisfazendo as condições do teste. Isso permitiu a construção da curva de contorno, apresentada na Figura 13 e 14, que ilustra as interações dos parâmetros e o nível ótimo de componentes testados na produção de caroteno.

$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides } (\mu\text{g/L}) = 1202,17 - 157,15 \cdot X_1 - 117,37 \cdot X_1^2 - 33,46 \cdot X_2 - 32,66 \cdot X_2^2 + 85,01 \cdot X_3 - 74,91 \cdot X_3^2 + 171,08 \cdot X_1 \cdot X_2 + 33 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 14})$$

$$\text{Concentração específica de carotenoides } (\mu\text{g/g}) = 128,88 - 16,88 \cdot X_1 - 7,44 \cdot X_1^2 - 5,98 \cdot X_2 - 5,99 \cdot X_2^2 + 10,85 \cdot X_3 - 4,71 \cdot X_3^2 + 17,50 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 15})$$

Onde X_1 = extrato de levedura; X_2 = peptona e X_3 = glicose.

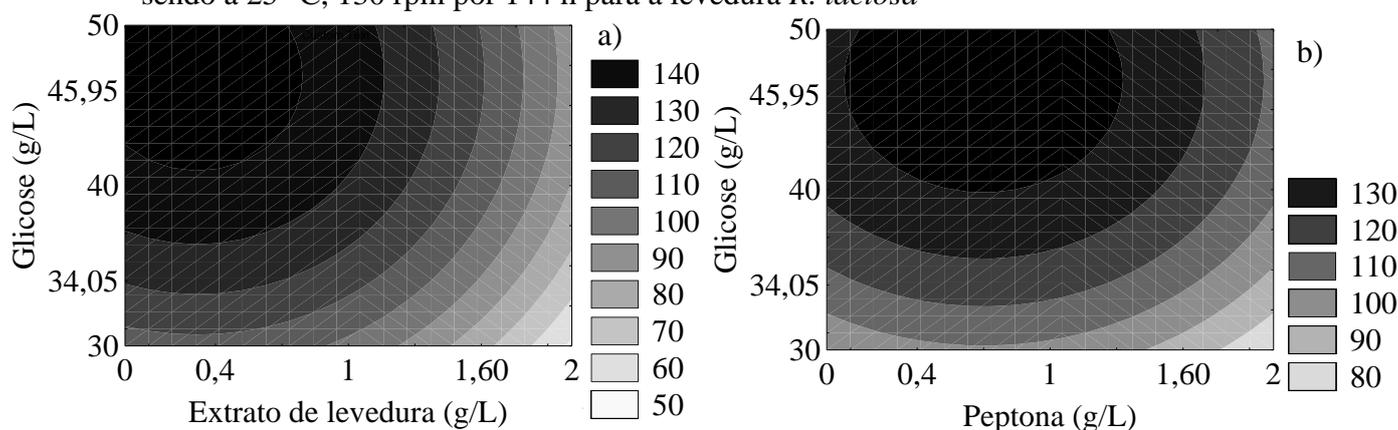
Figura 13: Curva de contorno para a concentração volumétrica (a e b) e concentração específica (c e d) de carotenoides em função de extrato de levedura, peptona e glicose sendo a 25 °C, 130 rpm por 144 h para a levedura *R. lactosa*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Analisando a Figura 13, é possível identificar uma condição ótima que satisfaça os parâmetros testados para obter uma região ótima quando são sobrepostas duas figuras (a e b) para a produção de carotenoides. Para obter a máxima concentração de carotenoides, o meio de cultivo deve conter de 0,4 a 1 g/L de extrato de levedura, 0,4 a 1,4 g/L de peptona, 38 a 45,95 g/L de glicose, além de 1 g/L de extrato de malte, 0,2 g/L de NKO_3 e 5 pH inicial, a 130 rpm e 25 °C.

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 *R. lactosa*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Por outro lado, para a produção específica de caroteno, ao analisar a Figura 14 (a e b), deve-se trabalhar com 0 a 0,4 g/L de extrato de levedura 0,3 a 1,2 g/L de peptona e 50 g/L de glicose, além de 1 g/L de extrato de malte, 0,2 g/L NKO_3 e 5 pH inicial, a 130 rpm e 25 °C.

Dessa forma, o meio de cultivo ótimo selecionado para validação do modelo deve ser formulado como 0,7 g/L de extrato de levedura (nível -0,5), 0,70 g/L de peptona (nível -0,5), 43 g/L de glicose (nível +0,5), 1 g/L de extrato de malte, 0,2 g/L NKO_3 e 5 pH inicial, a 130 rpm e 25 °C.

5.6.3. Planejamento fatorial completo 2^3 para a levedura *R. mucilaginosa*

A Tabela 32 apresenta os valores reais e codificados para o delineamento composto central rotacional 2^3 (DCCR) e suas respostas em termos do crescimento celular, concentração específica e volumétrica de carotenoides. Pode-se observar que as maiores concentrações volumétricas de carotenoides foram obtidas na região dos pontos centrais, enquanto a concentração celular permaneceu apresentou pouca variação em

todos os ensaios, devido a fixação da fonte de carbono.

Tabela 32: Delineamento composto central 2^3 (valores reais e codificados) para otimização do meio de cultivo para a levedura *R. mucilaginosa*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	1,11 (-1)	1,81 (-1)	5,87 (-1)	24,50	103,06	2715,46
2	2,92 (+1)	1,81 (-1)	5,87 (-1)	25,51	129,01	3290,67
3	1,11 (-1)	4,19 (+1)	5,87 (-1)	25,68	124,01	3184,53
4	2,92 (+1)	4,19 (+1)	5,87 (-1)	25,71	96,07	2469,73
5	1,11 (-1)	1,81 (-1)	7,10 (+1)	23,70	123,75	2932,41
6	2,92 (+1)	1,81 (-1)	7,10 (+1)	24,28	147,44	3580,17
7	1,11 (-1)	4,19 (+1)	7,10 (+1)	23,20	119,84	2780,57
8	2,92 (+1)	4,19 (+1)	7,10 (+1)	13,47	98,63	1328,73
9	0,5 (-1,68)	3 (0)	6,5 (0)	25,03	148,63	3719,66
10	3,5 (+1,68)	3 (0)	6,5 (0)	24,04	109,46	2971,32
11	2 (0)	1 (-1,68)	6,5 (0)	24,53	171,29	4201,30
12	2 (0)	5 (+1,68)	6,5 (0)	25,82	156,83	4050,11
13	2 (0)	3 (0)	5,5 (-1,68)	25,82	111,97	3532,97
14	2 (0)	3 (0)	7,5 (+1,68)	23,56	175,68	4139,86
15	2 (0)	3 (0)	6,5 (0)	24,36	179,75	4379,50
16	2 (0)	3 (0)	6,5 (0)	26,29	175,25	4269,78
17	2 (0)	3 (0)	6,5 (0)	24,15	169,70	4134,65

X₁ = Extrato de levedura (g/L), X₂ = Peptona (g/L) e X₃ = pH inicial. Glicose em 30 g/L e extrato de malte em 10 g/L. Y₁= Biomassa (g/L), Y₂ = Concentração específica de carotenoides (µg/g) e Y₃ = Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

No DCCR (Tabela 32), a produção máxima de carotenoides variou de 1328,73 µg/L (ensaio 8) a 4379,50 µg/L (ensaio 15) e a concentração de biomassa de 13,47 g/L (ensaio 8) a 26,29 g/L (ensaio 16) em 144 h. Com o planejamento, a concentração máxima de carotenoides foi aumentada em seis vezes e a biomassa quadruplicou, em comparação com a maximização das condições do processo (Tabela 9).

Os efeitos das três variáveis independentes (extrato de levedura, peptona e pH inicial) foram calculados, bem como o desvio padrão e os limites de confiança estão apresentados no Apêndice 14, para as respostas crescimento celular e concentração volumétrica e específica de carotenoides.

A Tabela 33 apresenta os coeficientes de regressão para os fatores estudados. Nota-se que todos foram significativos ($p < 0,05$) a 95% de confiança. Entretanto, somente a peptona e a interação extrato de levedura com pH inicial não apresentaram valores significativo ($p < 0,05$). Dessa forma, os coeficientes que não apresentaram significância ($p < 0,05$) foram incorporados a falta de ajuste para o cálculo da ANOVA

Tabela 33: Coeficiente de Regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta concentração volumétrica de carotenoides para a levedura *R. mucilaginosa*

	CVC ($\mu\text{g/L}$)				CEV ($\mu\text{g/g}$)				
	CR	EP	t (2)	p	CR	EP	t (2)	p	
Média*	4324,84	70,66	61,21	<0,001	Média*	176,64	2,90	60,90	<0,001
X ₁ (L)*	-161,30	33,20	-4,86	0,040	X ₁ (L)*	-22,07	1,50	-14,69	0,004
X ₁ (Q)*	-537,11	36,58	-14,68	<0,001	X ₂ (L)*	-6,52	1,36	-4,79	0,040
X ₂ (L)*	-220,54	33,20	6,64	0,020	X ₂ (Q)*	-9,67	1,50	-6,43	0,023
X ₂ (Q)*	-260,67	36,58	-7,13	0,020	X ₃ (L)*	10,59	1,36	7,77	0,016
X ₃ (Q)*	-363,17	36,58	-9,93	<0,001	X ₃ (Q)*	-16,83	1,50	-11,21	0,007
X ₁ ·X ₂ *	-423,70	43,36	9,77	0,010	X ₁ xX ₂ *	-12,35	1,78	-6,93	0,020
X ₂ ·X ₃ *	-256,43	43,36	-5,91	0,027					

* ($p < 0,05$), X₁: Extrato de Levedura (g/L), X₂: Peptona (g/L) e X₃: pH inicial. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Para a concentração específica de carotenoides, os termos extrato levedura (Q), peptona (Q) e as interações extrato levedura com pH inicial, bem como, peptona com pH inicial não apresentam efeito significativo, os demais termos foram significativos ao nível de confiança de 95%. Dessa forma, os coeficientes que não apresentaram significância ($p < 0,05$) foram incorporados a falta de ajuste para o cálculo da ANOVA que está apresentada na Tabela 31.

Para a resposta concentração volumétrica de carotenoides o $F_{\text{calculado}}$ (2,35) foi menor que o F_{tabelado} (3,29), entretanto como os fatores (X₁, X₂ e X₃) bem como as interações (X₁·X₂ e X₂·X₃) foram significativas ($p < 0,05$), além de apresentar um coeficiente de determinação (R²) 65%, que explica boa partes dos experimentos e tendo uma reprodutibilidade, foi levando em considerado para análise e foi obtido sua superfície de contorno.

Por outro lado, a resposta concentração específica de carotenoides, apresentou uma $F_{\text{calculado}}$ (4,30) maior que F_{tabelado} (3,22), satisfazendo a condição do teste F, e apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 72%, caracterizando uma boa reprodutibilidade dos experimentos, sendo possível obter a equação do modelo e gerar sua superfície, descrevendo a concentração específica de carotenoides.

A Equação 16 e 17 apresentam os modelos codificados de segunda ordem, que descrevem a concentração volumétrica e específica de carotenoides como função das variáveis independentes (extrato de levedura, peptona e pH inicial de cultivo), dentro da faixa estudada. Os modelos foram validados por análise de variância (Tabela 34). O coeficiente de correção (R) de 81% e 85% para concentração volumétrica e específica respectivamente, permitiu a construção da curva de contorno mostrada na Figura 15

$$\text{Concentração volumétrica de carotenoides } (\mu\text{g/L}) = 4324,84 - 161,30 \cdot X_1 - 537,11 \cdot X_1^2 - 220,54 \cdot X_2 - 260,67 \cdot X_2^2 - 363,17 \cdot X_3^2 - 423,70 \cdot X_1 \cdot X_2 - 256,43 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (\text{Eq. 16})$$

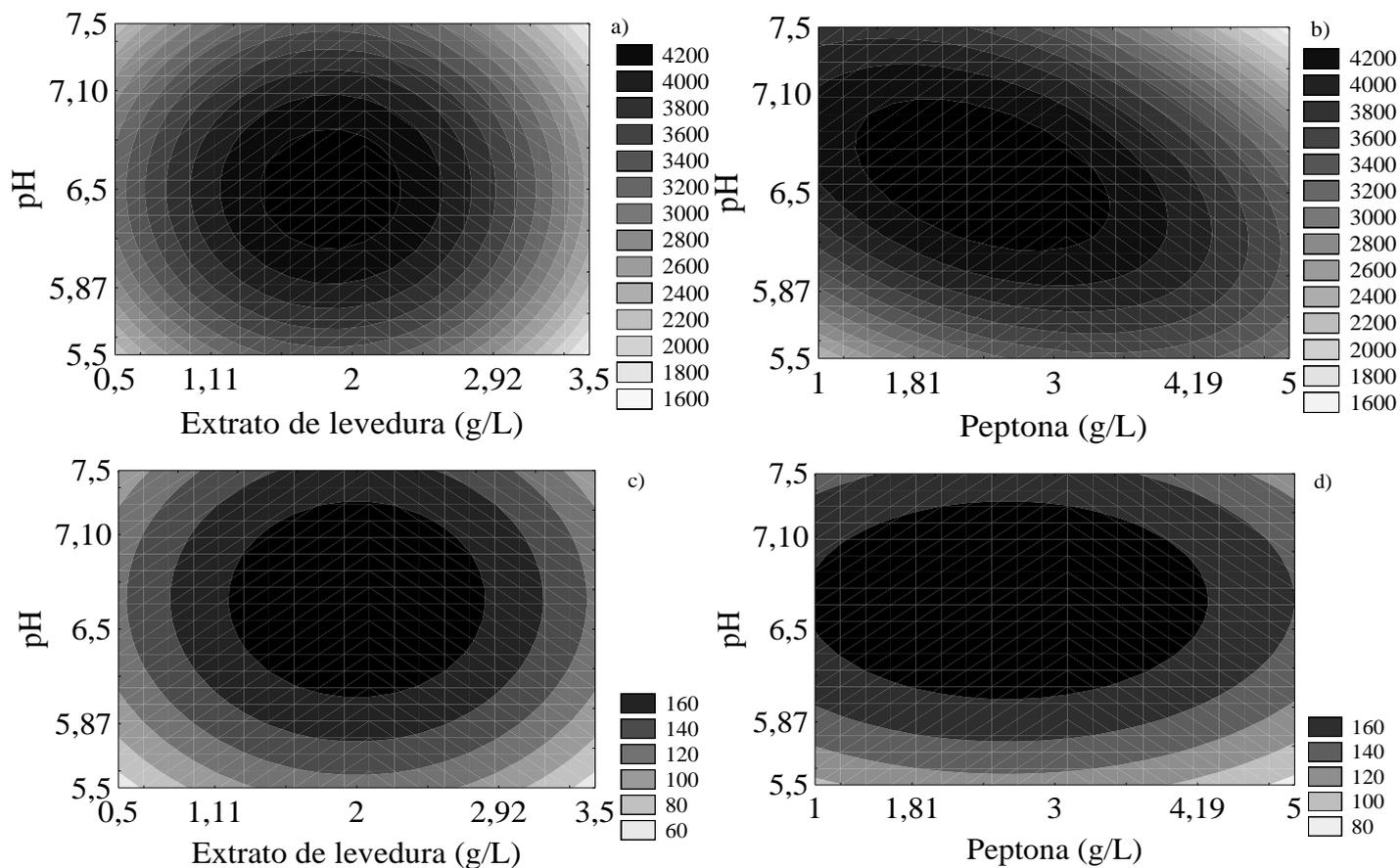
$$\text{Concentração específica de carotenoides } (\mu\text{g/g}) = 176,63 - 22,06 \cdot X_1^2 - 6,5 \cdot X_2 - 9,66 \cdot X_2^2 - 10,59 \cdot X_3 - 16,82 \cdot X_3^2 - 12,35 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (\text{Eq. 17})$$

Tabela 34: Análise de variância para o delineamento composto central 2^3 para a levedura *R. mucilaginosa*

	Fonte de	Soma	Graus de	Média	Valor		Fonte de	Soma	Graus de	Média	Valor
	variação	Quadrática	liberdade	quadrática	de <i>p</i>		variação	Quadrática	liberdade	quadrática	de <i>p</i>
Concentração volumétrica de carotenoides (µg/L)	X ₁ (Q)	5473,49	1	5473,49	0,004	Concentração específica de carotenoides (µg/g)	X ₁ (Q)	5473,49	1	5473,49	0,005
	X ₂ (L)	580,55	1	580,55	0,004		X ₂ (L)	580,55	1	580,55	0,041
	X ₂ (Q)	1048,84	1	1048,84	0,023		X ₂ (Q)	1048,84	1	1048,84	0,023
	X ₃ (L)	1531,18	1	1531,18	0,016		X ₃ (L)	1531,18	1	1531,18	0,016
	X ₃ (Q)	3183,74	1	3183,74	0,008		X ₃ (Q)	3183,74	1	3183,74	0,008
	X ₁ ·X ₂	1219,93	1	1219,93	0,020		X ₁ ·X ₂	1219,93	1	1219,93	0,051
	Regressão	6782347	7	968906,71			Regressão	10128,1	6	1688,02	
	Resíduo	3705554	9	411728,22			Resíduo	3920,64	10	392,064	
	Falta de ajuste	3675471	7				Falta de ajuste	3869,95	8		
	Erro puro	30083	2				Erro puro	50,69	2		
Total	10487901	16			Total	14048,74	16				

X₁: Extrato de Levedura (g/L), X₂: Peptona (g/L) e X₃: Glicose (g/L). Concentração volumétrica em carotenoides (R: 0,90, F_{7;9}; 0,95(tabelado) = 3,29, F_{calculado(modelo)} = 2,35) e Concentração específica em carotenoides (R: 0,90, F_{6;10}; 0,95(tabelado) = 3,22, F_{calculado(modelo)} = 4,30). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

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 *R. mucilaginosa*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Pelo modelo (Eq. 16 e 17), foi possível construir as curvas de contorno. Ao sobrepor as figuras (a e b), pode-se observar que, para obter a concentração máxima de carotenoides (Figura 15), o meio de cultura deve conter 1 a 3,5 g/L de peptona, 1,2 a 2,5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte e 30 g/L de glicose com pH inicial entre 6 a 7 a 130 rpm e 25 °C.

Ao analisar as Figuras 15 (c e d) pode-se obter uma região que satisfaça as variáveis testadas, para se obter a máxima concentração específica de carotenoides. Deve-se trabalhar na faixa entre 1,32 a 2,69 g/L de extrato de levedura, juntamente com 1 a 4,19 g/L de peptona, sendo pH inicial na faixa de 6,2 a 7,10, com 10 g/L de extrato de malte, 30 g/L de glicose, com pH inicial entre 6 a 7, a 130 rpm e 25 °C.

Portanto, depois de analisar a Figura 15 e com o objetivo de validar o modelo otimizado para a produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa*, o meio de produção ideal foi selecionado com 3 g/L de peptona (nível 0), 2 g/L de extrato de

levedura (nível 0), 10 g/L de extrato de malte, 30 g/L de glicose, 0,2 g/L de KNO₃, com pH inicial de 6,5 (nível 0), 130 rpm a 25 °C.

5.7. Validação dos experimentos na condição ótima

Para os processos otimizados com as leveduras *R. glutinis*, *R. lactosa* e *R. mucilaginosa*, foram obtidos os modelos que preveem a produção de corante, em função das variáveis independentes significativas encontradas para cada micro-organismo. Entretanto, foi necessário executar um experimento neste ponto ótimo, para garantir que o resultado previsto não tenha sido polarizado em relação ao valor prático.

Uma repetição do experimento foi realizada usando a condição ideal deduzida para cada levedura. Além disso, foi feito um acompanhamento cinético da biomassa, do pH e da produção de carotenoides até o tempo de 168 h de cultivo.

5.7.1. Validação dos experimentos para a levedura *R. glutinis*

Através do DCCR (2³), foi obtido uma equação de segunda ordem, que descreve o comportamento da produção de carotenoides. A resposta máxima prevista foi de 1308,43 µg/L quando os valores dos níveis das variáveis independentes e significativas (extrato de levedura (-0,5), peptona (-1) e glicose (+1)) são inseridos no modelo (Eq. 13).

O experimento de validação foi realizado após a determinação dos parâmetros ótimos apresentados no item 4.6. Ao realizar o experimento na condição ótima, foi constatada uma produção de 1333,11 µg/L. A confirmação pelos experimentos reais, por sua vez, validou o modelo. Além disso, a produção alcançou 1,89% a mais em relação ao modelo, como mostra a Tabela 35.

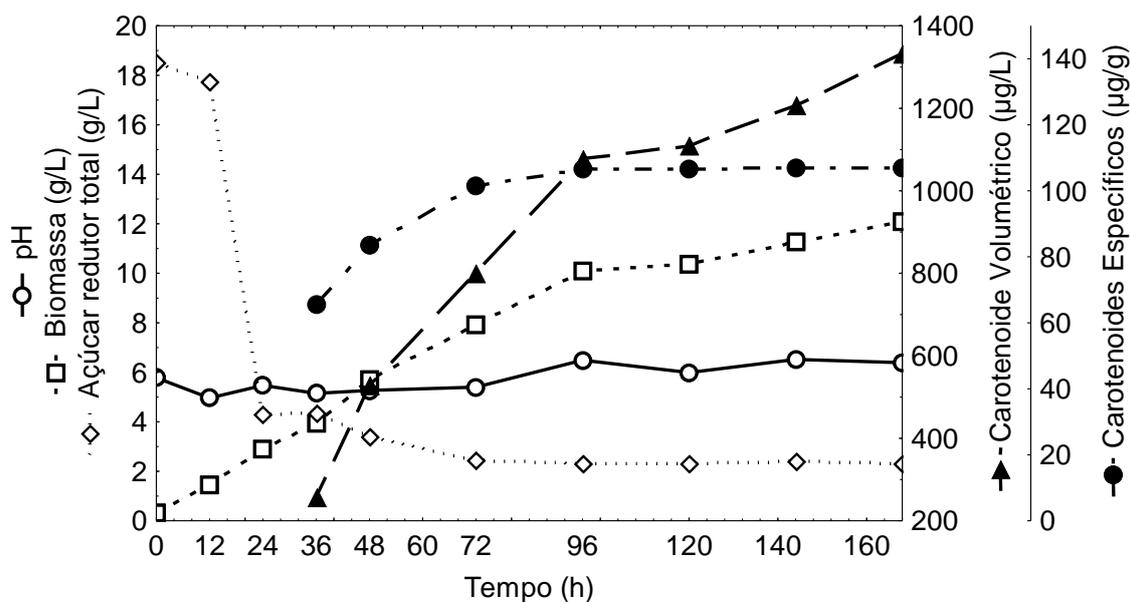
Tabela 35: Resposta da validação do modelo matemático para a levedura *R. glutinis*

	CVC (µg/L)
Resposta prevista	1308,43
Resposta experimental*	1333,11
Desvio do modelo (%)	1,89

*Resultados são médias dos ensaios em triplicatas. CVC = Concentração volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Ao mesmo tempo, uma cinética foi realizada para o acompanhamento da evolução da biomassa, do pH e da concentração volumétrica e específica de carotenoides. A Figura 16 apresenta os resultados médios da cinética durante a validação do modelo no meio de cultivo *yeast malt*.

Figura 16: Cinética da produção de carotenoides totais por *Rhodotorula glutinis* na validação dos modelos empíricos utilizando o meio de cultivo *yeast malt*.



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Pode-se ver na Figura 16 que, nas primeiras horas de cultivo, ocorre um rápido consumo de açúcares e uma evolução do crescimento celular até o final do processo, com a sua multiplicação celular progredindo rapidamente até 96 h. Em contraste com o crescimento celular, a produção de pigmentos estava em níveis baixos nas primeiras 48 horas. Os valores maiores na produção de carotenoides volumétricos foram detectados após 96 h, quando ocorre diminuição do crescimento celular.

Por outro lado, a concentração específica de carotenoides apresentou uma evolução até o tempo de 96 h, a partir desse período permaneceu constante até 168 h.

O pH estava na faixa entre 5,8 e 5,0 nas primeiras 12 h de cultivo e, após este intervalo, os valores aumentaram para a faixa de pH 6,0, passando por pequenas oscilações. A mudança do pH pode estar relacionada com a capacidade do microrganismo em converter os açúcares em ácidos orgânicos, e posterior consumo desses, por se tratar de um micro-organismo aeróbio, fenômeno natural que ocorre nas primeiras horas de cultivo, já relatado em outras investigações (TASKIN et al., 2016;

MACHADO e BURKERT, 2014).

Após o esgotamento das fontes de carbono, ocorre uma hidrólise dos peptídeos que causa o aumento no pH. Esse fenômeno foi observado por Valduga et al. (2014) utilizando substratos agroindustriais (glicerol, água de maceração de milho e água de arroz parabolizado) para a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*.

O efeito do pH na levedura *R. glutinis* já foi estudado por Kot et al. (2017), influenciando o crescimento celular e a concentração de carotenoides. A biossíntese de caroteno e a evolução celular foram induzidas por altos valores de pH (4,0 a 7,0). Esta afirmação é confirmada nesse estudo (Figura 16), onde a carotenogênese máxima foi induzida em 168 h a pH 6,4.

5.7.2. Validação dos experimentos para a levedura *R. lactosa*

Através do modelo (Eq. 14 e 15) a resposta máxima prevista foi de 1217,76 µg/L (130,79 µg/g) quando os valores dos níveis das variáveis independentes significativas (extrato de levedura (-0,5), peptona (-0,5) e glicose (+0,5)) são inseridos no modelo. Por outro lado, quando realizado uma repetição do experimento foi constatado uma produção de 1233,80 µg/L (156,60 µg/g). A confirmação pelos experimentos reais, por sua vez, validou o modelo. Além disso, a produção alcançou -6,41% e 7,57% a mais em relação ao modelo para concentração volumétrica e específica de carotenoides, respectivamente, como mostra a Tabela 36.

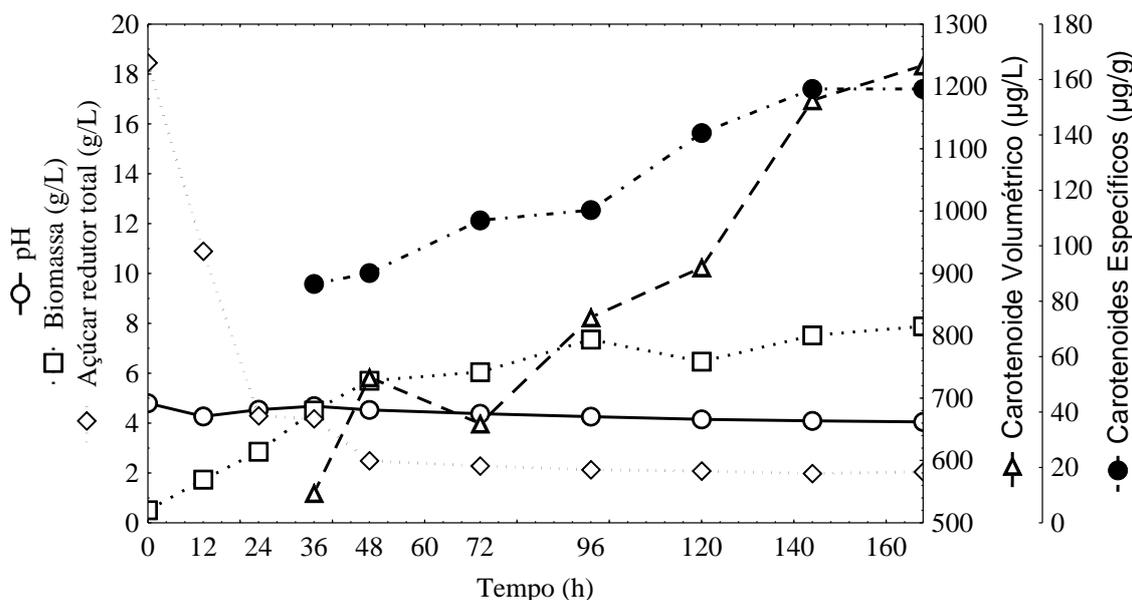
Tabela 36: Resposta da validação do modelo matemático para a levedura *R. lactosa*

	CVC (µg/L)	CEV (µg/g)
Resposta prevista	1318,27	145,58
Resposta experimental	1233,80	156,60
Desvio do modelo (%)	-6,41	7,57

*Resultados são médias dos ensaios em triplicatas. CVC. = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Carotenoides específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A Figura 17 apresenta os resultados médios da cinética do cultivo para pH, biomassa, concentração volumétrica e específica de carotenoides durante a validação do modelo no meio de cultivo *yeast malt*.

Figura 17: Cinética da produção de carotenoides totais por *Rhodotorula lactosa* na validação dos modelos empíricos utilizando o meio de cultivo *yeast malt*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

O perfil de consumo de açúcar redutor, foi o mesmo constatado para a levedura anterior (*R. glutinis*): nas primeiras 24 h de cultivo ocorre um rápido consumo dos açúcares disponíveis (18,45 para 4,29 g/L) e ao menos tempo uma evolução da biomassa até 72 h (0,51 para 6,04 g/L). A partir desse período, a biomassa fica estável com oscilações até 168 h.

Por outro lado, a concentração volumétrica de carotenoides apresenta taxa elevada na estabilidade da biomassa em 72 h, até 144 h, quando a síntese de corante apresenta uma redução até 168 h finalizando com 1233,80 µg/L.

Já a concentração específica de carotenoides inicia desde o período de quantificação, 36 h (86,20 µg/L) e evolui até 144 h (156,60 µg/L), permanecendo estável após este período.

Nota-se que o pH inicial 5 foi reduzido e manteve-se estável até o final do cultivo, 4,05, sendo constatado, nesse ponto, um odor ácido no final do cultivo. Isso significa que a levedura pode ser capaz de produzir algum ácido orgânico em associação ao corante.

O perfil constante de pH 4 também foi observado por Shichang et al. (2013), ao produzir lipídeo por *R. glutinis*. Quando o tempo de fermentação foi de 10 a 11 dias, o rendimento de lipídeo, biomassa e pH (3,5) foram diminuídos simultaneamente, devido ao processo de autólise da levedura, pela escassez de nutrientes. Nesse estudo, não foi

constatada uma diminuição nessas respostas, devido ao tempo de cultivo ser 168 h.

5.7.3. Validação dos experimentos para a levedura *R. mucilaginosa*

A partir do planejamento fatorial 2^{5-3} , chegou-se a três variáveis significativas no processo. Por DCCR (2^3), foi possível obter uma equação polinomial de grau dois (Eq. 16 e 17) que descreve o comportamento da concentração volumétrica e específica de carotenoides, em função das variáveis significativas (3 g/L de peptona (nível 0), 2 g/L de extrato de levedura (nível 0) e pH inicial (nível 0)), analisadas através da Figura 11. Sendo fixadas as variáveis 10 g/L de extrato de malte, 30 g/L de glicose, 0,2 g/L de KNO_3 , com pH inicial de 6,5, 130 rpm a 25 °C. Dessa forma, foi possível obter uma máxima produção teórica de carotenoides de 4324,84 $\mu\text{g/L}$ (176,63 $\mu\text{g/g}$).

Para a confirmação do resultado teórico, foi realizado um experimento nessa condição descrita como ótima, e verificou-se que a produção obtida foi de 4164,45 $\mu\text{g/L}$ (252.99 $\mu\text{g/g}$) com 16,46 g/L de biomassa. Além disso, a produção diminuiu 3,71% em relação ao modelo matemático para concentração volumétrica de carotenoides, mais por outro lado, um aumento de 43% em relação a Eq. 17 para concentração específica, como mostra a Tabela 37.

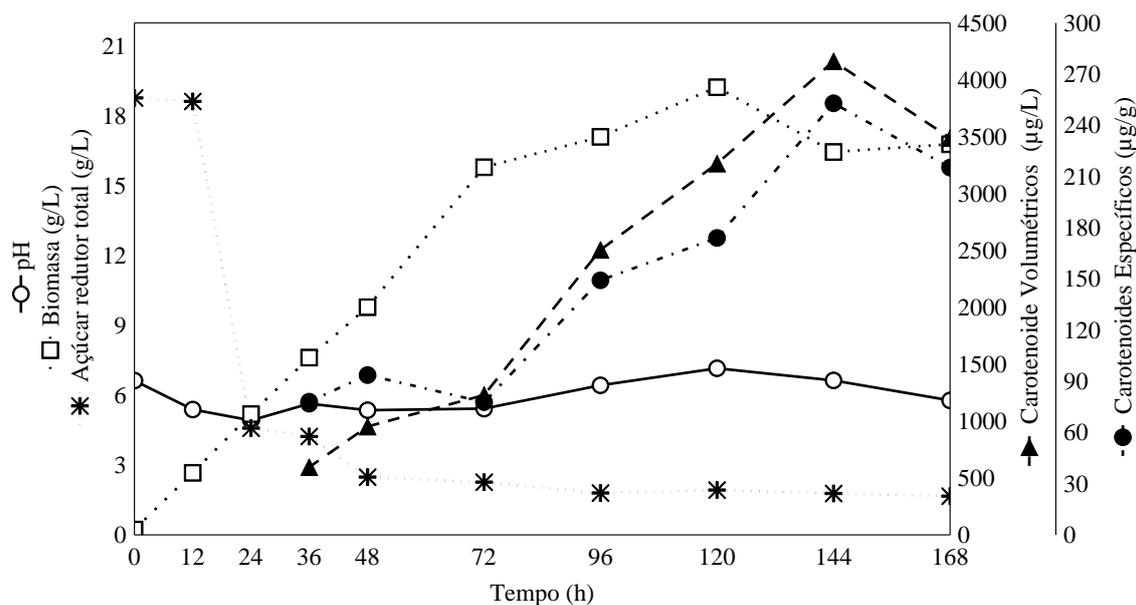
Tabela 37: Resposta da validação do modelo matemático para a levedura *R. mucilaginosa*

	CVC ($\mu\text{g/L}$)	CEV ($\mu\text{g/g}$)
Resposta prevista	4324,84	176,63
Resposta experimental*	4164,45	252.99
Desvio do modelo (%)	-3,71	43,23

*Resultados são médias dos ensaios em triplicatas. CVC = Carotenoide volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A Figura 18 apresenta os resultados médios da cinética do cultivo para pH, biomassa, concentração volumétrica e específica de carotenoides durante a validação do modelo no meio de cultivo *yeast malt*.

Figura 18: Cinética da produção de carotenoides totais por *Rhodotorula mucilaginosa* na validação dos modelos empíricos utilizando o meio de cultivo *yeast malt*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Pode-se ver na Figura 18 que, nas primeiras horas de cultivo, ocorre um rápido consumo de açúcares e uma evolução do crescimento celular em 72 h de processo. Em contraste com o crescimento celular, a produção de pigmentos estava em níveis baixos nas primeiras 48 horas. Os maiores aumentos na concentração volumétrica de carotenoides foram detectados após 72 h. Um comportamento semelhante no crescimento celular foi observado por *Rhodotorula glutinis* em meio suplementado com melaço de beterraba e sulfato de amônio (TASKING et al., 2016).

Após as 144 h, ocorre a produção máxima de carotenoides, 4261,31 µg/L (252,99 µg/g) e, a partir desse período, a produção diminui. O pH do cultivo mostra pouca variação ao longo do processo. Comportamento semelhante é observado com levedura de *Sporidiobolus pararoseus* em ambiente agroindustrial (glicerol bruto e água de maceração de milho), onde, em 24 horas de cultivo, ocorre o consumo de fonte de carbono e inicia a fase carotenogênica (MACHADO e BURKERT, 2015).

Inicialmente, a produção de carotenoides a partir da seleção de levedura foi de 635,94 µg/L. Ao melhorar as condições do processo, a produção foi de 4,32 mg/L, de acordo com o modelo matemático previsto pelo planejamento. O mesmo ocorreu com a produção inicial específica de carotenoides 122,46 µg/g. Com as melhorias indicadas pelo planejamento, verificou-se uma concentração máxima de 252,99 µg/g.

Comparando esses resultados com a literatura atual, observa-se comportamento

semelhante. Em um estudo com 18 leveduras coletadas de diferentes bancos de dados, *Rhodotorula glutinis* mostrou proeminência na assimilação de glicerol bruto. No processo de otimização do meio de cultura, as variáveis estudadas foram uma fonte de carbono (glicerol) e duas fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona), atingindo uma produção de 14,07 mg/L, aumentando a capacidade em 280% (CUTZU et al., 2013)

Já Cabral et al. (2011) utilizaram um planejamento Plackett-Burman para melhorar tanto as condições de processo (agitação, temperatura) bem como o meio de cultivo para a levedura isolada (*Sporidiobolus pararoseus*) aumentando em até 45% a quantidade de carotenoides, os quais constataram que fontes elevadas de glicose (60 g/L), extrato de malte (15 g/L) e peptona (15 g/L) influenciaram na bioprodução. Nesse trabalho, verificou-se que a levedura necessita de alta quantidade de glicose e moderada quantidade de fonte de nitrogênio (extrato de levedura) para um bom desempenho.

No isolamento efetuado por Aksu e Eren (2007), verificou-se que a levedura *Rhodotorula glutinis* apresenta influência no pH inicial e que a faixa de 6 a 6,5 favorece seu desenvolvimento, tendo um crescimento celular de 4,9 g/L. Nesse trabalho, constatou-se que o pH foi uma variável significativa e com efeito positivo sobre a bioprodução de pigmentos.

5.8. Aumento da produção de carotenoides (resumo)

A Tabela 38 descreve o aumento da concentração volumétrica e específica de carotenoides para as leveduras desde o isolamento até as melhorias feitas tanto no processo (agitação vs temperatura) como nos componentes do meio de cultivo YM.

Tabela 38: Produção de carotenoides desde o isolamento até a otimização

<i>Rhodotorula glutinis</i>			
	Biomassa (g/L)	CVC ($\mu\text{g/L}$)	CEV ($\mu\text{g/g}$)
Isolamento	6,65	790,31	118,84
Agitação e Temperatura	8,14	753,11	92,52
Componente de cultivo (YM)	12,10	1333,11	106,92

CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Tabela 38 Continuação: Produção de carotenoides desde o isolamento até a otimização

<i>Rhodotorula lactosa</i>			
	Biomassa (g/L)	CVC ($\mu\text{g/L}$)	CEV ($\mu\text{g/g}$)
Isolamento	4,00	776,67	194,17
Agitação vs Temperatura	5,05	894,74	188,4
Componente de cultivo (YM)	7,88	1233,80	156,60
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			
	Biomassa (g/L)	CVC ($\mu\text{g/L}$)	CEV ($\mu\text{g/g}$)
Isolamento	6,30	635,94	100,94
Agitação vs Temperatura	7,40	679,15	91,78
Componente de cultivo (YM)	16,46	4164,45	252,99

CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Após a otimização dos processos, foi selecionada a levedura em destaque, *R. mucilaginosa*, para a continuação do trabalho (batelada intermitente, ruptura com agentes não tóxicos e o uso de coprodutos agroindustriais como fontes alternativas de meio de crescimento).

5.9. Produção de carotenoides em batelada intermitente

A Figura 18 apresenta os resultados médios da cinética do cultivo para evolução do pH, crescimento celular, concentração volumétrica e específica de carotenoides durante o processo de batelada intermitente no meio de cultivo *yeast malt*.

Através dos resultados da batelada (item 4.7) da Figura 17, foi possível determinar qual o tempo indicado para realizar a remoção de parte do meio de cultivo, onde a taxa celular é alta no processo batelada, para a adição de 50% de novo meio. No tempo 120 h, a biomassa estava em 18,54 g/L e, no tempo 120 h', após a adição de novo meio de cultivo, em 9,34 g/L. No tempo 168 h, a levedura conseguiu reestabelecer a biomassa em 18,00 g/L e, após este tempo, ocorreu uma diminuição da biomassa. Entretanto, nesse período, ocorreu aumento da concentração volumétrico e específico dos carotenoides, que caracteriza um desenvolvimento secundário dos carotenoides quando a divisão celular é diminuída e/ou reduzida (MACHADO e BURKERT, 2015).

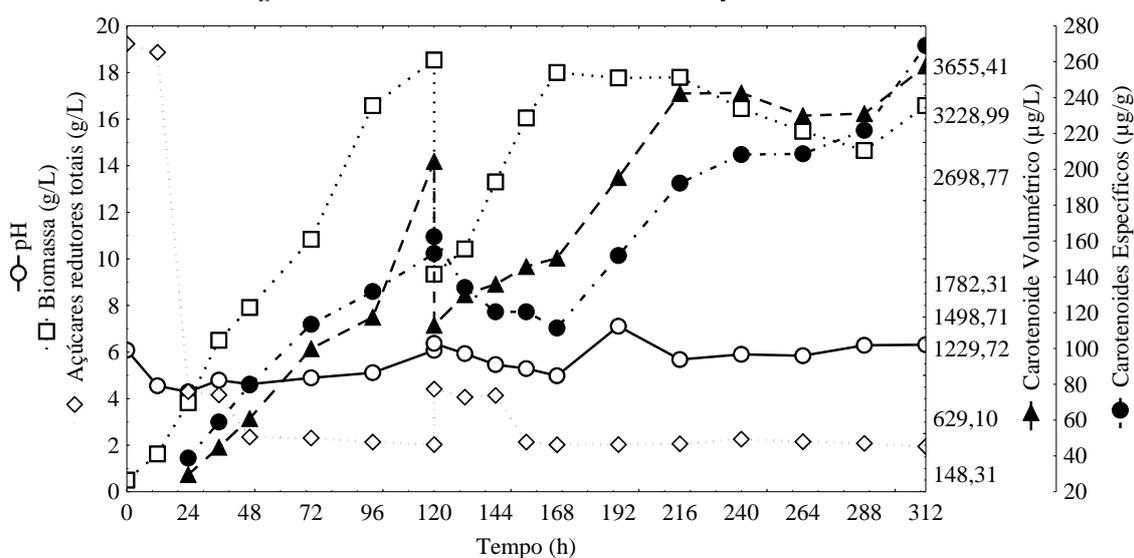
A concentração específica de carotenoides é o conteúdo intracelular medido através do peso da amostra seca de biomassa (50 miligramas de amostra). Foi

constatado que no processo em batelada intermitente a interferência é mínima e, além disso, este processo induz o aumento do acúmulo do caroteno (SAENGE et al., 2011). Em 120 h, a concentração específica de carotenoides estava em 153,06 $\mu\text{g/g}$, sendo restabelecida no tempo 192 h (151,87 $\mu\text{g/g}$) e superada no tempo 216 h (192,28 $\mu\text{g/g}$).

Por outro lado, a concentração volumétrica de carotenoide está associada com a biomassa e o conteúdo intracelular. No tempo 120 h, a produção, de 2837,40 $\mu\text{g/L}$, foi para 1429,05 $\mu\text{g/L}$ (120 \cdot h) uma redução de aproximadamente 50%, sendo superada após o tempo 192 h (2698,77 $\mu\text{g/L}$).

O consumo de açúcares do início do cultivo (19,23 g/L) foi praticamente esgotado em 48 h (2,35 g/L) e, após adição no tempo 120 h (4,41 g/L) teve um ligeiro aumento, sendo esgotado no tempo 156 h (2,13 g/L) e mantendo constante até o final do cultivo 312 h (1,95 g/L).

Figura 19: Cinética da concentração de carotenoides por batelada intermitente pela *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando o meio de cultivo *yeast malt*

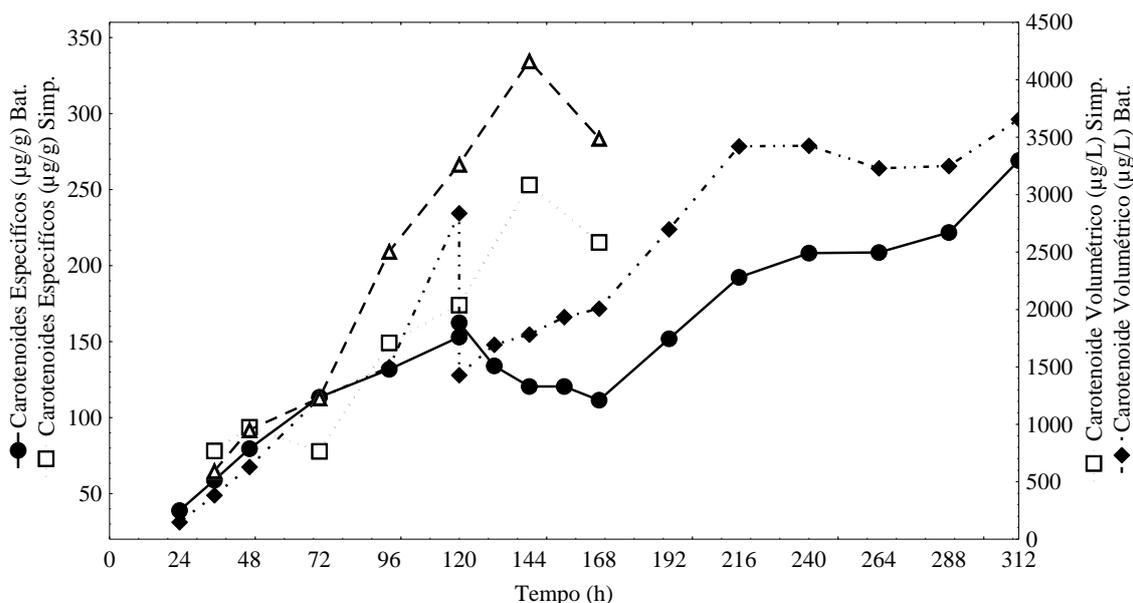


Fonte: Elaboração do autor, 2018.

A Figura 19 ilustra a comparação entre os dois processos de cultivo para produção de carotenos. A produção de carotenoides por batelada alcançou a máxima produção em 144 h com 4164,45 $\mu\text{g/L}$ em carotenoides, após este período ocorre uma diminuição da produção pelo esgotamento dos nutrientes. Entretanto, para a batelada intermitente, onde foi realizada a retirada de 50% do meio de cultivo no ponto 120 h, apresentou a máxima produção em 312 h com 3655,41 $\mu\text{g/L}$. Na Figura 20, no processo batelada alimentada intermitente, a produção alcançada ainda não é a máxima, indicando que as fontes de cultivo não foram esgotadas e que produção ainda pode ser

igual ou maior a batelada, mas necessitando de mais tempo de processo. Segundo Muliterno et al. (2005), o processo batelada alimentada intermitente também necessitou de mais tempo de produção quando comparando a batelada, porém a produção foi 5,1 vezes maior que a do processo de cultivo simples.

Figura 20: Cinética da comparação da concentração de carotenoides por batelada vs batelada intermitente pela *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando o meio de cultivo *yeast malt*



Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Por outro lado, nota-se que a produção máxima de carotenoide específica foi em 144 h (252,99 µg/g) para a batelada e para o processo intermitente 312 h (269,12 µg/g), apresentando os mesmos ganhos. Além disso, no processo intermitente pode-se recuperar os carotenoides tanto volumétrico (com redução mínima de 12%) ou específico a cada 7 dias, eliminando o tempo de pré inóculo e inóculo, que correspondem 4 dias a mais para processo simples, apresentando uma economia de tempo.

5.10. Extração em diferentes métodos de ruptura não tóxicos

Com o intuito de substituir o método tóxico de extração de corante e melhorar a concentração específica dos carotenoides, foi utilizado um teste com diferentes formas de ruptura para a parede celular da levedura por métodos químicos (ácidos), físicos (pérola de vidro e banho ultrassom) e a combinação de ambos, comparando como o método tradicional (DMSO - agente de ruptura dimetilsulfóxido).

Os ensaios foram realizados com a mesma quantidade de amostras (50 mg) e 2 mL de agente de ruptura DMSO ou ácidos, para obedecer ao mesmo índice de saturação pelo solvente.

De acordo com a Tabela 39, nenhum método não tóxico ou mesmo a sua combinação foi capaz de superar a extração com o DMSO. O método com ácido acético mais pérola de vidro apresentou uma concentração específica de 63,29 µg/g, maior valor dentre os métodos não tóxicos.

Tabela 39: Concentração específica de carotenoides, utilizando a combinação das técnicas de ultrassom, pérolas de vidro e ácido, na biomassa (*Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409)

Técnica	Concentração específica de carotenoides (µg/g)
Ácido Acético	29,63±1,48 ^{fg}
Ácido Clorídrico	30,59±0,52 ^{fg}
Ácido Lático	24,63±0,55 ^{ghi}
Ácido Fosfórico	26,13±0,76 ^{gh}
Ácido Acético + Pérola de vidro	63,29±6,57 ^c
Ácido Clorídrico + Pérola de vidro	44,75±1,72 ^{de}
Ácido Lático + Pérola de vidro	34,75±2,68 ^{efg}
Ácido Fosfórico + Pérola de vidro	44,12±2,62 ^{de}
Banho Ultrassom	45,72±1,09 ^d
Ultrassom + Ácido Acético	34,96±1,34 ^{efg}
Ultrassom + Ácido Clorídrico	39,21±2,86 ^{edf}
Ultrassom + Ácido Lático	14,54±0,81 ⁱ
Ultrassom + Ácido Fosfórico	19,38±0,15 ^{hi}
Ultrassom + DMSO	193,80±3,27 ^b
DMSO + Perola de vidro	269,12±10,24 ^a

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais não representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Por outro lado, o uso combinado de ácidos mais pérola de vidro promoveu ganho em todos os ensaios, pois o tempo de contato foi de 3 min. Somente a combinação de ácidos mais banho ultrassom não se mostrou elevada. Isso se deve ao tempo de contato de 40 min, ou seja, ao mesmo tempo que os carotenoides eram extraídos pelos ácidos, ocorria uma degradação do corante. Segundo Lopes et al. (2017),

ácidos como o clorídrico, por não apresentarem seletividade, podem prejudicar a recuperação de pigmento.

5.11. Produção de carotenoides em coprodutos

Com o interesse em usar o glicerol, manipueira e melaço de cana de açúcar nos meios de cultivo, foi feita a produção de carotenoides em diferentes concentrações para cada coproduto, para determinar os limites máximos de tolerância para a levedura *R. mucilaginosa*. A Tabela 40 mostra a quantidade de biomassa e carotenoides produzidos para cada coproduto.

Tabela 40: Produção de carotenoides por diferentes concentrações de coprodutos

Coprodutos	Biomassa (g/L)	CEV (µg/g)	CVC (µg/L)
10 g/L Mel	1,98±0,06 ^d	227,40±10,90^a	450,28±21,59 ^c
25 g/L Mel	5,81±0,03 ^c	201,04±10,55 ^a	1167,33±84,23 ^b
40 g/L Mel	8,70±0,16^a	210,43±3,33 ^a	1829,81±28,97^a
55 g/L Mel	8,25±0,03 ^b	206,07±11,29 ^a	1700,53±93,15^a
10 g/L Gli	1,86±0,20 ^a	223,74±17,59^a	416,50±32,74^a
25 g/L Gli	1,80±0,04 ^a	185,01±3,90 ^b	333,01±7,02 ^b
40 g/L Gli	1,87±0,05 ^a	128,79±4,13 ^c	241,07±7,73 ^c
55 g/L Gli	2,05±0,04 ^a	196,61±3,86 ^b	403,30±7,92^a
20 g/L Mani	1,37±1,37 ^c	132,59±12,99^a	181,79±17,80 ^b
40 g/L Mani	2,67±2,67 ^b	131,33±6,88 ^a	351,24±18,41^a
60 g/L Mani	5,41±5,41^a	31,44±3,14 ^b	170,05±16,99 ^b
80 g/L Mani	0,30±0,30 ^d	22,81±2,33 ^b	6,78±0,69 ^c

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais não representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Mel: Melaço de cana de açúcar, Gli: Glicerol bruto, Mani: Manipueira, CEV = Concentração específica de carotenoides e CVC = Concentração volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

Foi verificado que a levedura apresenta melhor produção para o meio contendo melaço de cana de açúcar, quando analisados os três coprodutos. Foi observado que quantidades de 40 a 55 g/L estimulam a síntese de carotenoides produzindo uma média de 1765,17 µg/L para o melaço.

Por outro lado, a outra fonte de carbono (glicerol) não apresenta a mesma performance, produzindo uma quantidade de caroteno inferior. Além disso, foram constatados dois picos de produção: um com 10 g/L (416,50 µg/L) e outro com 55 g/L (403,30 µg/L), provavelmente, em momentos de estresse celular, a levedura passou a desencadear a síntese de corantes. Para determinar a melhor faixa para a sequência dos

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.

**ANEXO 1: Laudo da identificação e depósito do isolamento de leveduras do bioma
Cerrado**

 UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA COLEÇÃO DE CULTURAS - MICOTECA URM	ADM-REG-017-01  Micoteca URM UFPE
---	--	---

COMUNICADO DE INCORPORAÇÃO DE AMOSTRA(S)

Recife, 16 de junho de 2016

Comunicamos que a(s) amostra(s) abaixo foi(ram) incorporada(s) ao acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, conforme pedido registrado sob número 45/16.

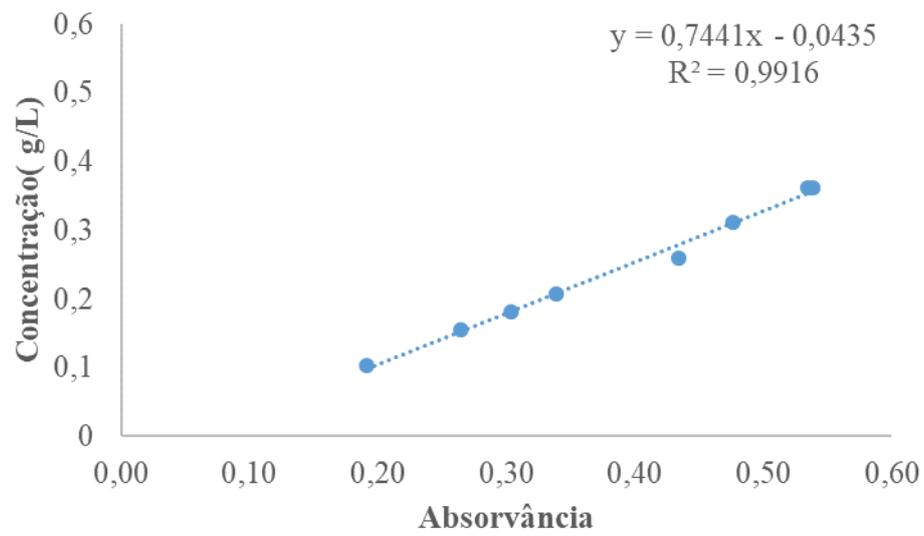
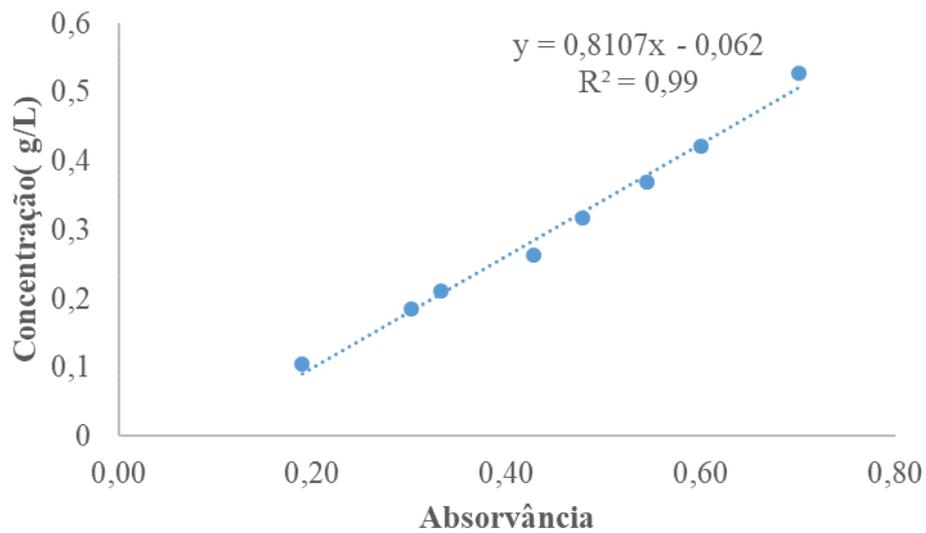
Nº	Código da Amostra	Nome da espécie	Código da Amostra concedido pela URM	Método e meio de preservação	Data de Incorporação
1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (E.C. Hansen) Van der Walt	7404	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
2	2	<i>Rhodotorula lactosa</i> T. Haseg.	7405	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
3	3	<i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresen.) F.C. Harrison	7406	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
4	4	<i>Rhodotorula graminis</i> Di Menna	7407	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
5	5	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> (Saito) Lodder	7408	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
6	6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A. Jörg.) F.C. Harrison	7409	Óleo mineral; S+Y	16/6/2016
7					
8					
9					
10					

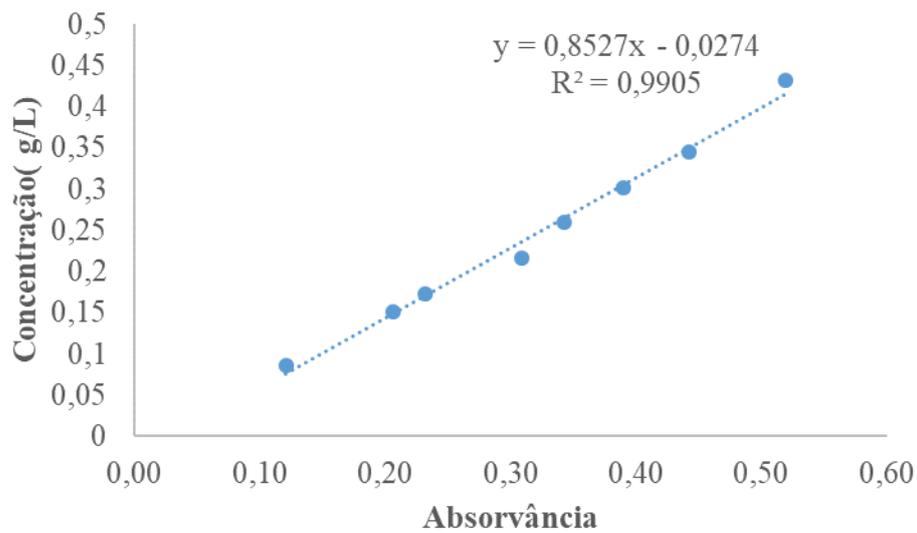
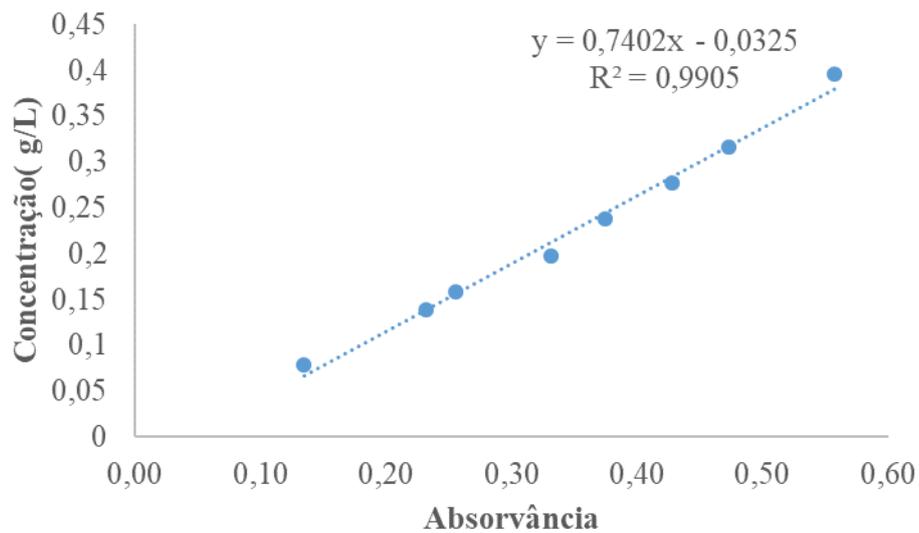
Atenciosamente,

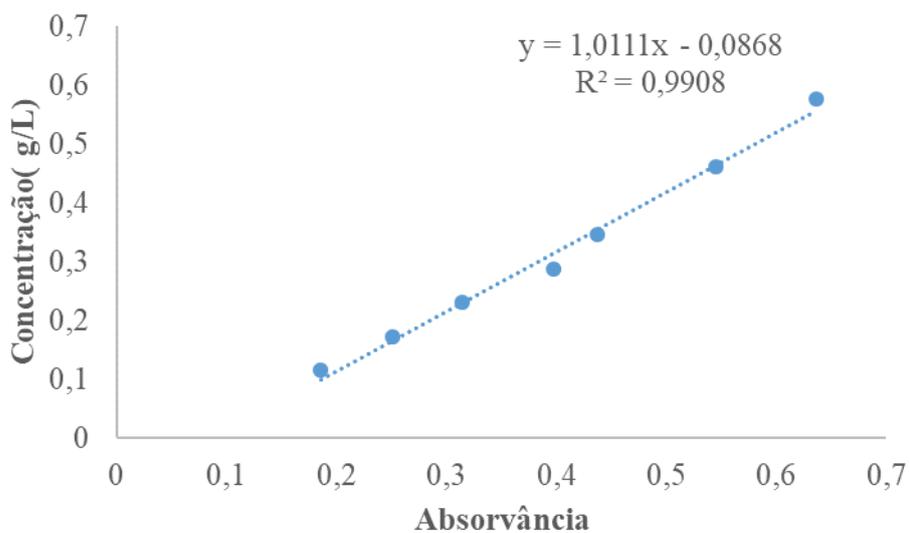
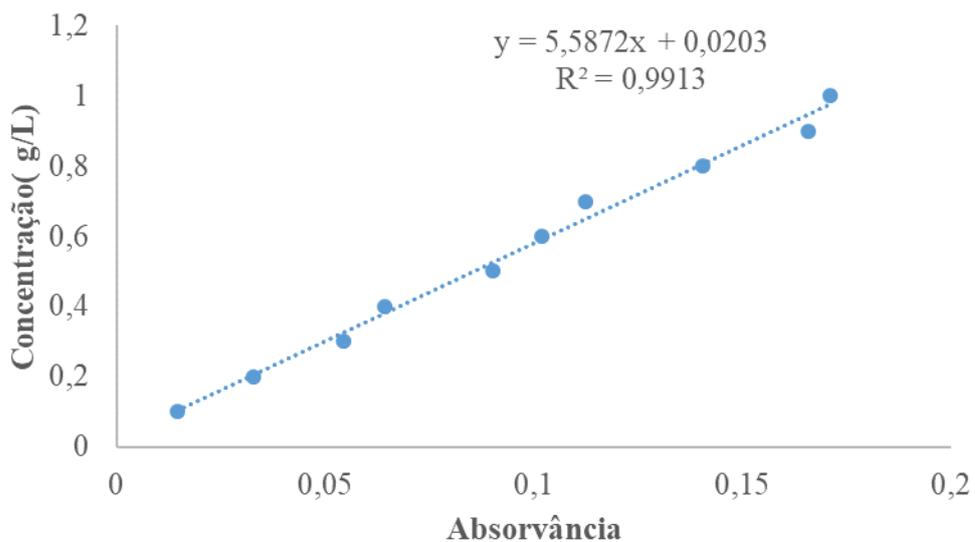


Prof. Cristina Maria de Souza Motta
Curadora da Micoteca URM

Obs: Amostra número um é levedura de outro pesquisador. Sendo identificado junto.

APÊNDICE 1: Curva padrão de biomassa para levedura *R. glutinis***APÊNDICE 2: Curva padrão de biomassa para levedura *R. graminis***

APÊNDICE 3: Curva padrão de biomassa para levedura *R. aurantiaca***APÊNDICE 4: Curva padrão de biomassa para levedura *R. lactosa***

APÊNDICE 5: Curva padrão de biomassa para levedura *R. mucilaginosa***APÊNDICE 6: Curva padrão de açúcar redutor**

APÊNDICE 7: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura *R. glutinis*

Efeitos, desvio padrão para a biomassa, concentração volumétrica e específica de carotenoides

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média*	6,44	0,072	89,489	<0,001
Biomassa (g/L)	(1) X₁ (L)	0,06	0,191	0,315	0,780
	(2) X₂ (L)*	-4,18	0,190	-21,939	<0,001
	X₁·X₂*	0,99	0,191	5,196	0,035
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média*	351,10	5,55	72,82	<0,001
CVC (µg/L)	(1) X₁ (L)*	-155,180	14,67	-10,46	<0,001
	(2) X₂ (L)*	-522,42	14,67	-35,60	<0,001
	X₁·X₂*	71,11	14,67	4,85	<0,001
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média*	60,22	0,31	195,05	<0,001
CEV (µg/g)	(1) X₁ (L)*	-13,42	0,41	-32,85	<0,001
	(2) X₂ (L)*	-23,23	0,41	-56,87	<0,001
	X₁·X₂*	-3,84	0,41	9,39	0,01

* ($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração Específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

APÊNDICE 8: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura *R. Graminis*

Efeitos, desvio padrão para a biomassa, concentração volumétrica e específica de carotenoides

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
Biomassa	Média*	5,16	0,08	68,26	<0,001
	(1) X₁ (L)*	-1,09	0,20	-5,45	0,03
	(2) X₂ (L)*	-4,04	0,20	-20,20	<0,001
	X₁·X₂	-0,59	0,20	-2,95	0,10
CVC (µg/L)	Média*	398,42	6,81	58,49	<0,001
	(1) X₁ (L)*	-245,94	18,02	-13,65	<0,001
	(2) X₂ (L)*	-247,38	18,02	-13,73	<0,001
	X₁·X₂*	-238,91	18,02	-13,26	<0,001
CEV (µg/g)	Média*	84,78	1,13	74,71	<0,001
	(1) X₁ (L)*	-47,24	3,00	-15,74	<0,001
	(2) X₂ (L)*	40,65	3,00	13,54	<0,001
	X₁·X₂*	-53,58	3,00	-17,85	<0,001

* ($p \leq 0,05$); X₁: Agitação (rpm); X₂: Temperatura (°C). CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

APÊNDICE 9: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura *R. aurantiaca*

Efeitos, desvio padrão para a biomassa e concentração volumétrica de carotenoides

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
Biomassa (g/L)	Média*	3,84	0,02	175,97	<0,001
	(1) X₁ (L)*	0,99	0,06	17,15	<0,001
	(2) X₂ (L)*	-1,96	0,06	-33,94	<0,001
	X₁·X₂*	0,54	0,06	9,35	0,01
CVC (µg/L)	Média*	164,34	1,02	161,34	<0,001
	(1) X₁ (L)*	-32,46	2,70	-12,04	<0,001
	(2) X₂ (L)*	-233,95	2,70	-86,81	<0,001
	X₁·X₂*	-22,66	2,70	-8,41	0,014

* ($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

APÊNDICE 10: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura *R. lactosa*

Efeitos, desvio padrão para a biomassa, concentração volumétrica e específica de carotenoides

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
Biomassa	Média*	3,51	0,03	121,64	<0,001
	(1) X₁ (L)	0,17	0,08	2,160	0,16
	(2) X₂ (L)*	-3,98	0,08	-52,18	<0,001
	X₁·X₂	0,17	0,08	2,16	0,16
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
CVC (µg/L)	Média*	420,43	5,25	80,07	<0,001
	(1) X₁ (L)*	-82,42	13,89	-5,93	0,3
	(2) X₂ (L)*	-789,82	13,89	-56,85	<0,001
	X₁·X₂*	73,66	13,89	5,30	0,033
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
CEV (µg/g)	Média*	97,62	1,28	76,52	<0,001
	(1) X₁ (L)*	-24,62	3,38	-7,29	0,018
	(2) X₂ (L)*	-145,54	3,38	-43,12	<0,001
	X₁·X₂*	17,52	3,38	5,19	0,035

*($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

APÊNDICE 11: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o planejamento das condições de processo para a levedura *R. mucilaginosa*

Resultados dos efeitos, desvio padrão, *t* e *p* para crescimento celular, concentração volumétrica e específica de carotenoides da *R. mucilaginosa*

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média*	5,86	0,07	89,47	<0,001
Biomassa	(1) X₁ (L)	0,05	0,17	0,29	0,80
	(2) X₂ (L)*	-3,80	0,17	-21,94	<0,001
	X₁·X₂*	0,90	0,17	5,20	0,04
	Média*	351,10	1,91	182,53	<0,001
CVC (µg/L)	(1) X₁ (L)*	-155,18	5,06	-30,66	<0,001
	(2) X₂ (L)*	-460,12	5,06	-90,90	<0,001
	X₁·X₂*	87,14	5,06	-17,22	<0,001
	Média*	55,84	0,28	194,81	<0,001
CEV (µg/g)	(1) X₁ (L)*	-28,23	0,74	-37,98	<0,001
	(2) X₂ (L)*	-46,07	0,74	-61,99	<0,001
	X₁·X₂	-3,34	0,74	-4,22	0,05

*($p \leq 0,05$), X₁: Agitação (rpm), X₂: Temperatura (°C), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEC = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

APÊNDICE 12: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para a otimização do meio de cultivo para a levedura *R. glutinis*

Resultados dos efeitos, desvio padrão, *t* e *p* para concentração volumétrica de carotenoides pela levedura *R. glutinis*.

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média*	1263,93	32,73	38,61	<0,001
	X₁ (L)*	-137,36	30,76	-4,47	0,047
	X₁ (Q)*	-323,38	33,89	-9,54	0,011
	X₂ (L)	2,33	30,76	0,08	0,946
CVC	X₂ (Q)	-71,31	33,89	-2,10	0,170
(µg/L)	X₃ (L)*	123,22	30,76	4,01	0,057
	X₃ (Q)*	-130,51	33,89	-3,85	0,061
	X₁·X₂*	-395,48	40,17	-9,84	0,010
	X₂·X₃	-211,83	40,17	-5,27	0,034
	X₂·X₃*	-167,80	40,17	-4,18	0,053

* ($p \leq 0,05$); X₁: Extrato de Levedura (g/L); X₂: Peptona (g/L); X₃: Glicose (g/L) e CVC = Concentração volumétrica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.

APÊNDICE 13: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para a otimização do meio de cultivo para a levedura *R. lactosa*

Resultados dos efeitos, desvio padrão, t e p para concentração volumétrica e específica de carotenoides da *R. lactosa*.

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
CVC (µg/L)	Média*	1202,17	11,66	103,07	<0,001
	X₁ (L)*	-314,30	10,96	-28,66	<0,001
	X₁ (Q)*	-234,75	12,08	-19,44	<0,001
	X₂ (L)*	-66,92	10,96	-6,11	0,033
	X₂ (Q)*	-65,33	12,08	-5,41	0,033
	X₃ (L)*	170,04	10,96	15,51	<0,001
	X₃ (Q)*	-149,84	12,08	-12,41	<0,001
	X₁·X₂*	342,13	14,31	23,90	<0,001
	X₂·X₃	17,89	14,31	1,25	0,338
	X₂·X₃*	66,01	14,31	4,61	0,044
CEV (µg/g)	Média*	128,88	2,31	55,80	<0,001
	X₁ (L)*	-33,6	2,17	-15,55	<0,001
	X₁ (Q)*	-14,89	2,39	-6,23	0,024
	X₂ (L)*	-11,96	2,17	-5,51	0,031
	X₂ (Q)*	-11,97	2,39	-5,01	0,038
	X₃ (L)*	21,69	2,17	9,99	0,099
	X₃ (Q)*	-9,42	2,39	-3,94	0,059
	X₁·X₂*	35,01	2,83	12,35	0,006
	X₂·X₃	4,91	2,83	1,73	0,226
X₂·X₃	9,26	2,83	3,27	0,082	

*($p \leq 0,05$), X₁: Extrato de Levedura (g/L), X₂: Peptona (g/L), X₃: Glicose (g/L), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEV = Concentração específica de carotenoides.
Fonte: Elaboração do autor, 2018.

APÊNDICE 14: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para a otimização do meio de cultivo para a levedura *R. mucilaginosa*

Resultados dos efeitos, desvio padrão, t e p para concentração volumétrica de carotenoides da *R. mucilaginosa*

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média*	4324,84	70,66	61,21	<0,001
	X₁ (L)*	-322,60	66,40	-4,86	0,039
	X₁ (Q)*	-1074,21	73,16	-14,68	0,004
	X₂ (L)	-441,07	66,40	-6,64	0,022
CVC	X₂ (Q)	-521,34	73,16	-7,13	0,019
(µg/L)	X₃ (L)	-2,78	66,40	-0,04	0,970
	X₃ (Q)*	-726,34	73,16	-9,93	0,099
	X₁·X₂*	847,40	86,72	-9,77	0,010
	X₂·X₃	-166,12	86,72	-1,92	0,195
	X₂·X₃*	-512,85	86,72	-5,91	0,027
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média*	176,64	2,90	60,90	<0,001
	X₁ (L)	-9,57	2,73	-3,51	0,072
	X₁ (Q)*	-44,13	3,00	-14,70	0,046
	X₂ (L)	-13,05	2,73	-4,79	0,041
CEC	X₂ (Q)	-19,31	3,00	-6,43	0,233
(µg/L)	X₃ (L)	21,19	2,73	7,77	0,162
	X₃ (Q)*	-33,66	3,00	-11,21	0,008
	X₁·X₂*	-24,70	3,56	-6,94	0,020
	X₂·X₃	1,12	3,56	0,31	0,783
	X₂·X₃	-10,18	3,56	-2,86	0,103

*($p \leq 0,1$), X₁: Extrato de Levedura (g/L), X₂: Peptona (g/L), X₃: pH inicial (g/L), CVC = Concentração volumétrica de carotenoides e CEC = Concentração específica de carotenoides. Fonte: Elaboração do autor, 2018.