



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES PRODUTORAS DE
CAROTENOIDES**

DEBORAH MUROWANIECKI OTERO

**Prof^a. Dr^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
Orientadora**

**RIO GRANDE-RS
MARÇO, 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES PRODUTORAS DE
CAROTENOIDES**

DEBORAH MUROWANIECKI OTERO

Dissertação apresentada como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**Prof^a. Dr^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert
Orientadora**

**RIO GRANDE-RS
MARÇO, 2011**

Dedico este trabalho às pessoas que foram e sempre foram os maiores exemplos em
minha vida, meus pais: Desirée e Ramiro Otero.

“O comprometimento é fundamental para o sucesso.”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Desireé e Ramiro, por acreditarem em mim e serem à base de todas as minhas conquistas, por não pouparem esforços na minha formação pessoal e profissional.

Sem eles, eu nada conseguiria; para eles, meu amor e minha eterna gratidão.

Meu irmão Rafael, por sempre se fazer presente, pela preocupação, pelo auxílio no computador, apoio e amor.

Ao William, pelo amor acima de qualquer circunstância, companheirismo, cumplicidade, carinho e por todos os momentos compartilhados à distância.

A Thais por se tornar, acima de tudo, minha amiga. Por me transmitir seu conhecimento sobre carotenoides, por ser companheira de laboratório, de ônibus e de divertimento.

As novas amigas que fiz na FURG, Cristina, Gabriela e Priscila, as viagens para Rio Grande se tornaram muito mais agradáveis com a companhia de vocês!!!

As minhas Iniciações Científicas: Bruna e Katira sem vocês não seria possível realizar todo o desenvolvimento experimental necessário para a realização desta dissertação.

Aos queridos companheiros de todos os dias Nina, Mariano, Chico, Renata e Elisane vocês tornaram o período do Mestrado muito mais divertido, com vocês o riso, o café e o pão-de-queijo era garantido. Obrigada, o carinho de vocês foi fundamental para suportar o cansaço, o estresse e muitas vezes as decepções ao longo do desenvolvimento da dissertação.

Ao pessoal do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos: Daiane, Eliane, Michele, Vanessa e Bruno pelas inúmeras vezes em que se dispuseram a ajudar e também pelos momentos alegres compartilhados.

A Elisane, por ser essa pessoa sempre disposta a ajudar, pelas sugestões ao longo do trabalho, pelas conversas, risadas, contribuições técnicas e pessoais, por ter sempre paciência comigo, principalmente quando eu perguntava milhões de vezes a mesma coisa!!!!

Aos Laboratórios de Microbiologia e Engenharia de Bioprocessos por disponibilizar equipamentos fundamentais para realização desse trabalho e pela presteza.

À minha orientadora Janaína Burkert pela confiança que me foi dada sem ao menos me conhecer, pela orientação e preocupação ao longo do trabalho.

Ao professor Carlos André Burkert pelas contribuições e por disponibilizar o laboratório para a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia: Ana, Ailton, Anna Rafaela, Joana e Felipe pelas inúmeras ajudas, sejam elas técnicas ou pessoais e também pelos momentos de descontração.

A todas aquelas pessoas que contribuíram, nos diferentes municípios durante as coletas das amostras ambientais.

A FURG por proporcionar a realização do Mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao professor Carlos Rosa pela identificação das leveduras e ao professor Rui Carlos Zambiasi pela identificação dos carotenoides.

A Islanda e Aline pela paciência e atenção ao longo desses dois anos e também pelos momentos descontraídos na hora do cafezinho.

E todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, seja através de contribuições técnicas ou por um sorriso.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS _____	v
LISTA DE TABELAS _____	ix
LISTA DE FIGURAS _____	x
RESUMO _____	xiii
ABSTRACT _____	xiv
CAPÍTULO I _____	1
1. INTRODUÇÃO _____	2
2. OBJETIVOS _____	4
2.1 Objetivos gerais _____	4
2.2 Objetivos específicos _____	4
CAPÍTULO II _____	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	6
3.1 Estrutura dos carotenóides _____	6
3.2 Biodisponibilidade dos carotenoides _____	7
3.3 Importância dos carotenoides _____	8
3.4 Aplicação dos carotenoides _____	8
3.5 Fatores que exercem influência sobre a produção de carotenoides _____	9
3.6 Biodiversidade _____	10
3.7 Micro-organismos carotenogênicos _____	12
3.8 Screening e seleção de micro-organismos produtores de carotenoides _____	13
3.9 Coprodutos agroindustriais _____	15
3.10 Produção de carotenoides utilizando coprodutos agroindustriais _____	18
CAPÍTULO III _____	21
Artigo 1: PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES ATRAVÉS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SUL DO BRASIL _____	22

RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 Coleta de amostras	26
2.2 Isolamento de leveduras	26
2.3 Manutenção de cepas isoladas	26
2.4 Inóculo	27
2.5 Bioprodução de carotenoides	27
2.6 Análises estatísticas	28
2.7 Métodos analíticos	28
2.8 Identificação das leveduras	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1 Isolamento e seleção de micro-organismos carotenogênicos	34
3.2 Screening dos micro-organismos selecionados	37
3.3 Seleção e identificação das leveduras	42
4. CONCLUSÕES	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
Artigo 2: APROVEITAMENTO DE COPRODUTOS INDUSTRIAIS NA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES	58
RESUMO	59
ABSTRACT	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 Micro-organismos	62
2.2 Substratos alternativos	62
2.3 Inóculo	64
2.4 Bioprodução de carotenoides	64
2.5 Métodos analíticos	65
2.6 Análises estatísticas	66

2.7 Cinética do cultivo microbiano e parâmetros de	
processo _____	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	68
4. CONCLUSÕES _____	79
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	80
CAPÍTULO IV _____	83
4. CONCLUSÕES GERAIS _____	84
4.1 Sugestões para trabalhos futuros _____	85
CAPÍTULO V _____	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	87
APÊNDICE _____	96

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1: Estrutura química de alguns carotenoides _____ 7

CAPÍTULO III

ARTIGO I

Figura 1: Bioprodução de carotenoides em agitador orbital _____ 22

Figura 2: Recuperação de carotenoides através de ruptura celular _____ 29

Figura 3: Micro-organismos isolados de cada fonte de obtenção _____ 34

Figura 4: Cinética de crescimento da levedura D3, consumo de substrato, produção de carotenoides e pH em meio YM _____ 43

Figura 5: Cinética de crescimento da levedura B1, consumo de substrato, produção de carotenoides e pH em meio YM _____ 44

Figura 6: Cinética de crescimento da levedura A19, consumo de substrato, produção de carotenoides e pH em meio YM _____ 45

Figura 7: Cromatograma de carotenoides produzidos pela levedura *Sporobolomyces pararoseus* _____ 50

Figura 8: Cromatograma de carotenoides produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* _____ 51

Figura 9: Cromatograma de carotenoides produzidos pela levedura *Pichia fermentans* _____ 52

ARTIGO 2

Figura 1: Cinética de crescimento da levedura *Sporobolomyces pararoseus*, consumo de substrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio YM _____ 68

Figura 2: Cinética de crescimento da levedura *Sporobolomyces pararoseus*, consumo de substrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio agroindustrial A _____ 69

Figura 3: Cinética de crescimento da levedura *Sporobolomyces pararoseus*, consumo de substrato, produção de carotenoides, evolução

do pH e produção de biomassa para o meio agroindustrial B_____	69
Figura 4: Cinética de crescimento da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , consumo de subtrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio YM_____	72
Figura 5: Cinética de crescimento da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , consumo de subtrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio agroindustrial A__	72
Figura 6: Cinética de crescimento da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , consumo de subtrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio agroindustrial B__	73
Figura 7: Cinética de crescimento da levedura <i>Pichia fermentans</i> , consumo de subtrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio YM_____	74
Figura 8: Cinética de crescimento da levedura <i>Pichia fermentans</i> , consumo de subtrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio agroindustrial A _____	75
Figura 9: Cinética de crescimento da levedura <i>Pichia fermentans</i> , consumo de subtrato, produção de carotenoides, evolução do pH e produção de biomassa para o meio agroindustrial B _____	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Tabela 1: Programa de gradiente de eluição utilizado na separação de carotenoides individuais em amostras ambientais _____ 33

Tabela 2: Características das colônias de leveduras isoladas, cidade de origem e ecossistemas pertencentes _____ 35

Tabela 3: Teor de carotenoides totais (média \pm desvio padrão), biomassa (média \pm desvio padrão), carotenoides específicos (média \pm desvio padrão) e pH final dos micro-organismos selecionados com características visuais amarelas _____ 38

Tabela 4: Teor de carotenoides totais (média \pm desvio padrão), biomassa (média \pm desvio padrão), carotenoides específicos (média \pm desvio padrão) e pH final dos micro-organismos selecionados com características visuais laranja _____ 40

Tabela 5: Teor de carotenoides totais (média \pm desvio padrão), biomassa (média \pm desvio padrão), carotenoides específicos (média \pm desvio padrão) e pH final dos micro-organismos selecionados com características visuais rósea _____ 41

ARTIGO 2

Tabela 1: Caracterização parcial dos substratos presentes nos meios de cultivo _____ 63

Tabela 2: Meios de bioprodução de carotenoides utilizando coprodutos agroindustriais _____ 64

Tabela 3: Parâmetros cinéticos e estequiométricos do cultivo em meio YM e agroindustriais para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* _____ 77

Tabela 4: Parâmetros cinéticos e estequiométricos do cultivo em meio YM e agroindustriais para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* _____ 77

Tabela 5: Parâmetros cinéticos e estequiométricos do cultivo em meio YM e agroindustriais para a levedura *Pichia fermentans* _____ 78

RESUMO

A bioprospecção microbiana é uma importante atividade da microbiologia industrial, possibilitando a descoberta de micro-organismos com alto potencial para a produção de bens de interesse da indústria química, alimentícia, farmacêutica e agrícola. O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, e o Rio Grande do Sul possui oito áreas consideradas prioritárias, ecossistemas diferenciados totalizando 82.000 km². Existe um grande interesse em encontrar espécies de micro-organismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos de interesse para indústria de alimentos em particular. O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar cepas de leveduras silvestres produtoras de carotenoides a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais coletadas em dois ecossistemas distintos e com as leveduras mais promissoras realizar cultivos utilizando coprodutos agroindustriais. Foram coletadas amostras da biodiversidade contida em solos, flores, folhas e frutos presentes na área do Litoral Médio e na região do Escudo Sul-Rio-Grandense. As amostras foram incubadas em meio Extrato de Malte e Levedura (YM) a 30°C por 48h, logo após inoculadas em ágar YM a 30°C por 120h. Foram isoladas 683 colônias com características carotenogênicas, estas foram transferidas para ágar YM a 30°C, e reisoladas pelo método de esgotamento por estrias, ao término foram consideradas 65 leveduras para a bioprodução. A bioprodução de carotenoides foi realizada através de cultivos submersos em frascos agitados, com meio de produção YM a pH inicial de 6,0, a 25°C, 150 rpm por 168h, acompanhando pH, biomassa e carotenoides totais. Foram identificadas três leveduras como sendo as mais promissoras, sendo uma amarela, uma laranja e uma vermelha. As leveduras selecionadas foram identificadas como *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. A levedura *Sporobolomyces pararoseus* apresentou valores máximos de carotenoides específicos de 123,64 µg/g e volumétricos de 905 µg/L, um pH final de 8,38, produção de biomassa de 7,32 g/L, após 168 h de cultivo. Os valores máximos para a levedura *Pichia fermentans* foram alcançados em 168 h de cultivo, atingindo 54,07 µg/g e 640 µg/L, a biomassa máxima (11,84 g/L) foi atingida ao término do cultivo assim como o pH de 8,15. O comportamento da *Rhodotorula mucilaginosa* frente a produção do pigmento foi mais baixa, com valores máximos de 28,06 µg/g e 310 µg/L em um pH de 8,02 em 11,18 g/L de biomassa. As cepas mais promissoras foram selecionadas e avaliadas em diferentes coprodutos industriais como o glicerol, melão, água de parboilização de arroz, como fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo, visando uma minimização dos custos e valorização destes coprodutos na bioprodução de carotenoides. Os resultados da bioprodução de carotenoides específicos no meio YM para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* e *Pichia fermentans* foi de 123,64 µg/g e 54,07 µg/g respectivamente. Porém a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* teve sua máxima produção de 30,16 µg/g dos carotenoides no meio contendo melão e água de parboilização de arroz. Dentre as leveduras a *Sporobolomyces pararoseus* apresentou os maiores valores de $Y_{P/X}$ para os diferentes meios testados, obtendo 19,56 para o YM, 7,89 para o meio contendo glicerol e água de parboilização de arroz e 10,94 para o meio contendo melão e água de parboilização de arroz. O meio YM permitiu a obtenção das maiores produtividades do produto de interesse tanto para *Sporobolomyces pararoseus* quanto para *Pichia fermentans* porém, o mesmo não ocorreu para *Rhodotorula mucilaginosa* que alcançou valores mais elevados em meio contendo água de parboilização e melão.

Palavras-chave: leveduras silvestres, screening, carotenoides.

ABSTRACT

The bioprospection microbial is an important activity of the industrial microbiology, making possible the discovery of microorganisms with high potential for the production of good of interest of industry. Brazil withholds about 20% of biodiversity, and the Rio Grande do Sul possesses 8 priority areas, totalizing 82,000 km². A great interest in finding species of microorganisms not yet catalogued exists that are producing of insumos of interest for food industry. The objective of this work was to isolated and to select strains of producing wild yeast of carotenoids from present biodiversity in ambient samples collected in two distinct ecosystems and with the leavenings most promising to carry through cultives using agroindustrials products. Samples of the biodiversity contained in soil, flowers, leaves, bark and fruits were collected gifts in the area of the Average Coast and in the region of the South-River Shield. The samples had been incubated in Yeast and Malt Extract medium (YM) at 30°C for 48 h, and then inoculated in YM agar at 30°C for 120 h. Had been isolated 683 colonies with carotenogenics characteristics, were transferred to YM agar at 30°C, and reisolated by streak plate method, to the ending had been considered 65 leavenings for the bioproduction. The bioproduction of carotenoids was carried out by submerged cultivation in flasks containing the YM production medium at initial pH 6.0 plus 10% inoculum at 25°C, 150 rpm for 168 h. As a result, the pH, biomass and total carotenoids were determined. Three yeast had been identified as being most promising, being a yellow one, an orange and a red. The leavenings selected had been identified as *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* and *Rhodotorula mucilaginosa*. The *Sporobolomyces pararoseus* presented maximum values of carotenoids (123,64 µg/g and 0,905 µg/mL), pH end of cultivate of 8,38, production of biomass 7,32 g/L in 168 h cultivate. The maximum values of bioproducts for the *Pichia fermentans* had been reached in 168 h cultivate , reaching average values of 54,07µg/g and 0,640µg/mL, the maximum biomass (11,84 g/L) was reached to the ending of the cultivate as well as pH 8,15. The behavior of the *Rhodotorula mucilaginosa* front the production of the carotenoids was lower, with maximum values of 28,06µg/g and 0,310 µg/mL in one pH of 8,02 and biomass of 11,18 g/L. Strains more promising were selected and evaluated in different agroindustrial coproducts as glicerine, sugar cane molasses, rice parboilization wastewater, as sources of carbon and nitrogen in the way of culture, aiming at a minimization them costs and valuation of these coproducts in the carotenoids bioproduction. The results of the carotenoids bioproduction for the *Sporobolomyces pararoseus* and *Pichia fermentans* were bigger in the half YM (123,64 µg/g and 54,07 µg/g respectively) however the *Rhodotorula mucilaginosa* had its maximum production (30,16 µg/g) of the carotenoids in the way contend sugar cane molasses and rice parboilization wastewater. The *Sporobolomyces pararoseus* presented the biggest values of $Y_{P/X}$ of 19,56 for the YM, 7,89 for the media A and the 10,94 for the half B. The half YM allowed the attainment of the biggest for *Sporobolomyces pararoseus* in such a way productivity how much for *Pichia fermentans* however the same did not occur for *Rhodotorula mucilaginosa* that reached higher values of the bioproductos in way contends rice parboilization wastewater and sugar cane molasses.

Key-words: wild yeast, screening, carotenoids

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são hidrocarbonetos lipossolúveis abundantemente encontrados na natureza com mais de 600 estruturas caracterizadas, com uma produção estimada em 100 milhões de toneladas por ano. São responsáveis pelas cores que variam de amarelo ao vermelho de frutas, vegetais, fungos e flores, utilizados comercialmente como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais. Os carotenoides também são encontrados em micro-organismos, nos quais são sintetizados pela rota metabólica dos isoprenóides. Aproximadamente 80 carotenoides diferentes são sintetizados por bactérias fotossintéticas e em alguns fungos filamentosos, algas e leveduras (UENOJO, 2007).

Os carotenoides têm a estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formados por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. Este esqueleto básico pode ser modificado através de várias maneiras, como reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação (UENOJO, 2007).

Dentre os pigmentos naturais, os carotenoides sobressaem-se devido às suas propriedades fisiológicas, como ação antioxidante, além de atuar como corantes. Muitos estudos têm apontado seu papel na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer, revelando atividades protetoras frente a injúrias causadas por metais, atuando também no fortalecimento do sistema imunológico e redução do risco de doenças como catarata e degeneração macular (MULLER, 2003; AUGUSTI, 2007).

Devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos (ZENI, 2009), que vem se destacando devido a fatores como: possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução, denominação de substâncias naturais, pequeno espaço de produção e controle das condições de cultivo (TATSCH, 2008).

O principal interesse em produzir carotenóides microbianos, que podem de outra maneira ser isolados das plantas e dos animais ou ser sintetizados, é a facilidade de aumentar a produção pela manipulação ambiental e genética. Porém, o uso comercial dos micro-organismos com potencial biotecnológico para produzir carotenoides é limitada principalmente pelo custo elevado de produção. Entretanto, este custo de cultivo pode ser minimizado aperfeiçoando/otimizando seu processo e aproveitando coprodutos industriais

de menor custo como fontes nutrientes alternativas (MALDONADE, SCAMPARINI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

Existem muitos micro-organismos produtores de carotenoides, porém apenas alguns são biotecnologicamente interessantes, destacando-se a produção de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* e pela microalga marinha *Dunaliella* e a produção de astaxantina pela microalga *Haematococcus sp.*, uma bactéria marinha (*Agrobacterium aurantiacum*) e pela levedura *Phaffia rhodozyma* (CHUMPOLKULWONG *et al.*, 1997).

O isolamento e seleção de micro-organismos potenciais produtores de carotenoides como astaxantina, toruleno, β -criptoxantina, luteína e β – caroteno é descrita na literatura (ANDRADE, 2003; MALDONADE *et al.*, 2008; LIBKIND e BROOCK, 2006; ZENI, 2009). Algumas leveduras como *Phaffia rhodozyma* (LIU *et al.*, 2007), *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU e EREN, 2007), vem estão sendo estudadas com a finalidade de maximização e/ou otimização da bioprodução de carotenoides, visando à utilização industrial.

As leveduras destacam-se pelo potencial de crescimento e produção de carotenoides a partir de diferentes coprodutos e resíduos agroindustriais utilizados como substratos alternativos, como glicerol oriundo da produção do biodiesel (SILVA, 2010), melaço da cana-e-açúcar (VALDUGA, 2008), água de parboilização do arroz (SILVA, 2009) e água de maceração de milho (VALDUGA, 2008).

Dentre estes coprodutos e resíduos industriais, o glicerol oriundo da produção do biodiesel e a água de parboilização do arroz apresentam destaque no cenário regional, enquanto o melaço aparece como um importante coproduto nacional. Portanto, torna-se de suma importância a busca por novos micro-organismos que sejam produtores carotenogênicos e que sejam capazes de aproveitar estes resíduos agroindustriais, visando à minimização dos custos com o meio de produção e agregando valor aos mesmos, utilizados como substratos alternativos para bioprodução industrial de carotenoides.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar cepas de leveduras silvestres produtoras de carotenoides a partir da biodiversidade presente em amostras ambientais coletadas em dois ecossistemas (Litoral Médio e Escuso Sul riograndense) do Rio Grande do Sul.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar as leveduras presentes nas amostras ambientais e mantê-las conservadas para manutenção de suas características originais;
- Selecionar dentre as leveduras isoladas as que apresentarem coloração carotenogênica e maior bioprodução específica de carotenoides, indentificando-as quanto ao gênero e espécie, bem como os carotenoides produzidos;
- Testar com a(s) cepa(s) mais promissora(s) diferentes resíduos e coprodutos industriais como o glicerol, melão e água de parboilização de arroz, como fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) no meio de cultivo, numa relação C/N similar ao meio padrão, visando à substituição de componentes para minimização dos custos e valoração destes coprodutos na bioprodução de carotenoides.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta informações sobre as características dos carotenoides como: estrutura, biodisponibilidade, importância, produção, screening e aplicação de micro-organismos produtores de biopigmentos, bem como coprodutos utilizados para produção de carotenoides.

3.1. Estrutura dos carotenoides

Os carotenoides (Figura 1) são geralmente tetraterpenóides de 40 átomos de carbono, de coloração amarela, laranja ou vermelha. As moléculas possuem um sistema de duplas ligações que constituem o grupo cromóforo responsável pela cor que proporcionam aos alimentos. São ligações interatômicas, entre os átomos de carbono, denominadas conjugadas. Para que a cor amarela apareça, são necessárias no mínimo sete ligações conjugadas. O aumento no número de ligações conjugadas resultam em maiores bandas de absorção e maiores comprimentos de onda, e neste caso tornam-se mais vermelhos (MORAIS, 2006).

Classificam-se em carotenos que são hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de insaturação (β -caroteno e licopeno, por exemplo), ou xantofilas que são sintetizadas a partir dos carotenos por meio de reações de hidroxilação e epoxidação (luteína e zeaxantina, por exemplo). Em decorrência da presença das insaturações, os carotenoides são sensíveis à luz, temperatura, acidez, oxidação, sendo compostos hidrofóbicos, lipofílicos, insolúveis em água e solúveis em solventes, como acetona, álcool e clorofórmio (AMBRÓSIO, 2006; LINS, 2006).

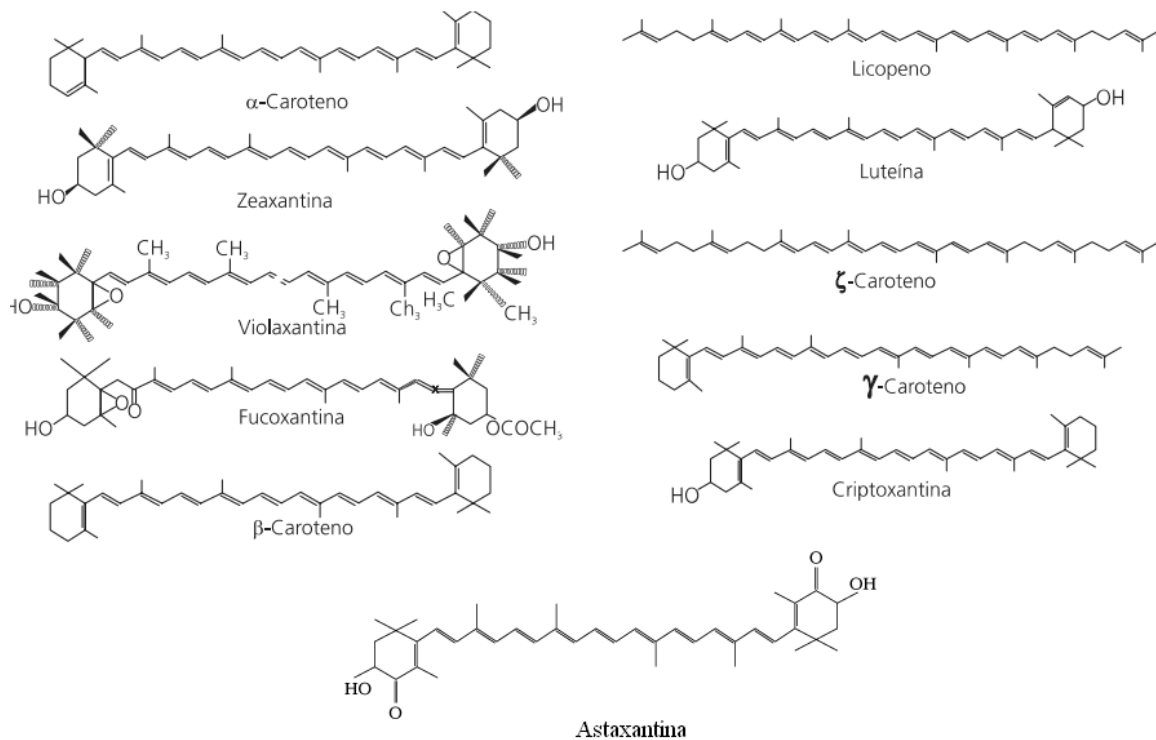


Figura 1: Estrutura química de alguns carotenoides (AMBRÓSIO, 2006).

3.2 Biodisponibilidade de carotenoides

Os carotenoides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, encontrados em tecidos fotossintetizantes, fungos, bactérias, leveduras, algas, animais e também em partes não fotossintéticas de plantas, como frutas, flores, sementes, raízes, verduras, aves, certos peixes e crustáceos. Estes pigmentos têm despertado a curiosidade dos cientistas desde o aparecimento da química orgânica devido as suas relevantes funções e ações (SILVA e MERCADANTE, 2002; MULLER, RODRIGUEZ - AMAYA e LOURENÇO 2003).

Estes pigmentos apresentam cerca de 600 estruturas já caracterizadas, sendo identificados de várias fontes, porém somente 40 são encontrados em alimentos. Alguns exemplos de carotenoides são: licopeno, astaxantina, luteína, β e α - caroteno, entre outros, apresentados na Figura 1 (GOMES, 2007).

3.3 Importância dos carotenoides

Nos últimos anos as evidências científicas dão importância aos carotenoides não apenas pela sua ampla aplicação como corantes de alimentos e como precursores de vitamina A, mas também pelos efeitos benéficos para a saúde humana com propriedades antioxidantes e atividades biológicas importantes, destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, câncer, doenças cardiovasculares, além de revelar também atividades protetoras frente a injúrias causadas por metais e atuar no fortalecimento do sistema imunológico (MULLER, RODRIGUEZ - AMAYA e LOURENÇO 2003; HIANE, 2003; BOTELLA-PAIVA e RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; MALDONADE *et al.*, 2007; AKSU e EREN, 2007; AUGUSTI, 2007). A proteção contra tais doenças, oferecida pelos carotenoides, é associada especialmente à sua ação antioxidante, pela capacidade de seqüestrar o oxigênio singlete e reagir com radicais livres. Todavia, outros mecanismos também são conhecidos: modulação do metabolismo carcinógeno, aumento da resposta imune, inibição da proliferação celular, incremento da diferenciação celular, estímulo da comunicação célula-célula e filtração de luz azul (OLSON, 1999; GALE, *et al.* 2001; NISHIN, 2002; OMONI, 2005; SENTANIN e RODRIGUEZ – AMAYA, 2007).

3.4 Aplicação de carotenoides

Os carotenoides podem ser utilizados industrialmente como corantes ou substâncias bioativas em rações, cosméticos, alimentos e fármacos (ZENI, 2009). Porém, comercialmente são usados principalmente como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais (pró-vitamina A), com um mercado global de aproximadamente U\$\$ 935 milhões/ano (FRASER e BRAMLEY, 2004).

Devido a uma maior conscientização da toxicidade de alguns aditivos, como os corantes, vários países tomaram medidas para regularizar seu uso em produtos alimentícios, cosméticos e medicinais, gerando maior interesse pelos corantes naturais.

Este impacto pode ser visualizado pela menor utilização industrial dos corantes obtidos por via química, pois cerca de 38% dos corantes utilizados industrialmente são sintéticos, 50% naturais e/ou idênticos aos naturais, onde 65% destes corantes abastece o mercado de bebidas não-alcólicas, alimentos preparados e confeitaria (ZENI, 2009).

A produção biotecnológica de carotenoides para a aplicação industrial através de micro-organismos tem sido assunto de destaque nos últimos anos, pois a grande maioria dos carotenoides utilizados industrialmente é obtida por via química ou extração de plantas e algas. Porém, com a preocupação do uso de aditivos químicos nos alimentos, houve um crescente interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos (VALDUGA, 2005) e devido ao elevado valor destes produtos a obtenção de carotenoides microbianos tornou-se uma área de intenso estudo (TATSCH, 2008).

O incremento nos últimos anos do interesse na produção de carotenoides naturais a partir de micro-organismos em relação aos isolados de plantas e animais ou sintetizados quimicamente é devido à facilidade de aumentar a produção pelas condições de cultivo e manipulação genética. Sendo a produção e o perfil de carotenoides obtidos variáveis, dependendo do micro-organismo, meio de cultura e condições operacionais como temperatura, pH, agitação, taxa de aeração e luminosidade. Além disso, a produção ocorre em pequeno espaço de tempo, não estando sujeita às condições ambientais, existindo também a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenoides de maior importância comercial e a utilização de substratos de baixo custo (ZENI, 2009).

3.5 Fatores que exercem influência sobre a produção dos carotenoides

A produtividade de um bioprocessamento em um dado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando não somente o crescimento celular como a produção de pigmento (LIU e WU, 2007). Portanto os micro-organismos podem acumular vários tipos de carotenoides como resposta ao estresse das condições ambientais (BHOSALE, 2004).

Melhorar a eficiência da biossíntese de carotenoides pode aumentar a produção dos pigmentos. Juntamente com as condições de cultivo, a biossíntese de carotenoides é conduzida pelo nível e atividade das enzimas biossintéticas e o fluxo total de carbono do sistema sintetizante. Assim, uma alta produção pode ser alcançada alternando-se o nível e a atividade destas enzimas ou a via biossintética, pela utilização de uma abordagem molecular (BHOSALE, 2004).

A biossíntese dos carotenoides naturalmente ocasiona mudanças no pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento microbiano. De modo geral, o pH do meio

decrece nas primeiras 72 h de processo, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final do processo (FRENGOVA, *et al.*, 1994).

A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos micro-organismos, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese. A temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides, e mudanças na concentração enzimática definitivamente controlam o nível de carotenoides nos micro-organismos (FRENGOVA, *et al.*, 1994).

A produção e o acúmulo de carotenoides são possivelmente afetados pela irradiação de luz branca em algas, fungos e bactérias. Contudo, a intensidade e forma de iluminação variam com o micro-organismo. A teoria da foto indução pode ser descrita em dois aspectos, no primeiro o efeito da luz sobre o crescimento do micro-organismo exerce papel fundamental, como estimulante na produção; o segundo aspecto considera que o acúmulo de carotenoides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides (BHOSALE, 2004).

3.6 Biodiversidade

A biodiversidade ou diversidade biológica inclui a variedade de vida no planeta, abrangendo os genes, as espécies de flora, fauna e micro-organismos, os ecossistemas terrestres e aquáticos e os processos ecológicos associados (MALDONADE, 2003).

A bioprospecção ou *screening* de micro-organismos é hoje uma das mais importantes atividades da microbiologia industrial, contribuindo para o conhecimento da biodiversidade, da ecologia e do metabolismo microbiano, e possibilitando a descoberta de micro-organismos com alto potencial para a produção de bens de interesse da indústria química, alimentícia, farmacêutica e agrícola (BIODIVERSIDADE, 2010).

A composição total da biodiversidade brasileira não é conhecida e talvez nunca venha a ser, sabendo-se, entretanto que o número de espécies ainda não identificadas pode alcançar a ordem de dezena de milhões. Mas essa diversidade, ao mesmo tempo em que representa uma excepcional riqueza de patrimônio genético e paisagístico, torna o ecossistema extremamente frágil. A destruição de parcelas, ainda que pequenas,

destes ecossistemas pode significar a perda irreversível de inúmeras espécies, por vezes sequer estudadas pela ciência (BIODIVERSIDADE, 2010).

Apesar da grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos micro-organismos existentes na Terra, tenham sido descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos (mamíferos, répteis, anfíbios, aves, peixes e plantas), resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. No entanto os micro-organismos, mesmo exercendo funções vitais nos ecossistemas e na biosfera em geral foram pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto à dificuldade na pesquisa destes seres invisíveis a olho nu (HERNALSTEENS, 2006).

Neste contexto é fundamental a implementação de programas na busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira. Atualmente, há um grande interesse em encontrar espécies de micro-organismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral e à de alimentos em particular, bem como otimizar processos de produção desses insumos a partir de micro-organismos já conhecidos (GOLDBECK, 2008).

É importante notar também os imensos avanços científicos e econômicos obtidos a partir de estudos de micro-organismos, resultando não somente na biotecnologia moderna, como em melhorias na qualidade de vida dos seres humanos em geral (HERNALSTEENS, 2006).

Com o advento da biologia molecular e outras técnicas avançadas de estudo de micro-organismos, a atenção dos pesquisadores está se voltando a estes organismos. Estas pesquisas estão começando a dar uma idéia da grandeza deste mundo desconhecido, sabendo-se que sua diversidade fisiológica, metabólica e genética não encontra paralelo em nenhuma outra classe de seres vivos (HERNALSTEENS, 2006).

Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade mundial, e no estado do Rio Grande do Sul pode ser encontrada em 8 áreas consideradas prioritárias, ecossistemas diferenciados totalizando aproximadamente 82.000 km² denominados: Campos de Cima da Serra, Turvo, Quarta Colônia, Campos da Campanha, Escudo Sul-riograndense, Nascente do rio Forqueta, Litoral Norte e Litoral Médio (BIODIVERSIDADE, 2010).

O Escudo Sul Rio-grandense compreende os municípios de Caçapava do Sul, Encruzilhada do Sul, Lavras do Sul, Pinheiro Machado e Santana da Boa Vista, totaliza

uma área de 12.734 Km², faz parte da chamada Serra do Sudeste e, principalmente devido à variação geológica muito rica em formações vegetais, ocorrendo pelo menos onze tipos de vegetações. Segundo o IBGE predomina a formação Savana Gramíneo-lenhosa formada por campos finos e campos místicos. Os morros são cobertos de plantas características da região, endêmicas e ameaçadas pelo extrativismo, podendo-se citar principalmente cactáceas e petúnias. O turismo rural-ecológico, associado à manutenção de pastagens naturais apresenta potencialidade de incremento. Já o Litoral Médio compreende as cidades de Barra do Ribeiro, Capivari do Sul, Mostardas, Palmares do Sul, São José do Norte, Tapes, Tavares e Viamão as quais totalizam 8.098 Km². Grande parte da área é essencialmente uma restinga separando a Lagoa dos Patos do Oceano Atlântico. São bastante comuns os banhados, os maricazais, sarandizais e os campos de várzea. As caporococas e os cactos estão entre as principais espécies da flora. A urbanização acelerada e os problemas derivados desta apresentam-se como riscos à biodiversidade e a conservação dos recursos naturais (BIODIVERSIDADE, 2010).

3.7 Micro-organismos carotenogênicos

Existem diversas fontes de obtenção de biopigmentos, como os carotenoides, os quais podem ser sintetizados por algas e cianobactérias (azuis e verdes), bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ZENI, 2009).

A produção comercial de carotenoides pelo processo biotecnológico merece destaque para os seguintes micro-organismos: o fungo *Blakeslea trispora* (β -caroteno e licopeno), a microalga marinha *Dunaliella salina* (β -caroteno), a microalga de água doce *Haematococcus sp.* (astaxantina), as leveduras *Phaffia rhodozyma* (astaxantina), *Rhodotorula sp* (toruleno e β -caroteno) e *Rhodospiridium sp.* (toruleno e β -caroteno), *Dacrymyces deliquescens* (luteína), *Rhodotorula glutinis* (toruleno e torularrodina) (MULLER, RODRIGUEZ-AMAYA e LOURENÇO, 2003; ZENI, 2009; DUFOSSÉ *et al.*, 2005, MALDONADE, 2003).

A capacidade do cultivo de leveduras em meio com alto teor de açúcar faz com que estes micro-organismos sejam industrialmente interessantes. São micro-organismos predominantemente unicelulares, possuindo reprodução vegetativa por brotamento ou fissão. Leveduras tais como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces sp.* e *Phaffia*

rhodozyma estão sendo estudadas com a finalidade de maximização e otimização da bioprodução de carotenoides, visando à utilização industrial (ZENI, 2009).

3.8 Screening e seleção de micro-organismos produtores de carotenoides

Zeni (2009) realizou um screening de micro-organismos em frutas, chás, solos de videiras, produtos alimentícios processados em decomposição e amostras de farinha de trigo. Os ensaios de bioprodução de carotenóides foram realizados em frascos agitados de 250 mL contendo 90 mL de meio de cultivo (40 g/L glicose, 10 g/L extrato de malte e 14 g/L de peptona) e incubadas a 25°C, 180 rpm, pH inicial de 4,0 por 120 h e sem iluminação. Destas foram isolados um total de 116 micro-organismos, no qual 16 eram leveduras, 65 bactérias e 35 fungos filamentosos. Os micro-organismos denominados W8, K1 e B7 demonstraram grande potencial para produção de carotenoides com pigmentação predominantemente rósea alcançando uma produção volumétrica de carotenoides totais de 818, 707 e 730 µg/L, respectivamente. Entretanto, os maiores produtores de carotenoides possuíam coloração predominantemente amarela, e foram codificados como W1, Q3 e B3 com valores que variaram entre 1063 a 2563 µg/L.

Silva (2009) estudou três cepas diferentes da levedura *Phaffia rhodozyma* para a produção de carotenoides, avaliando diferentes meios de cultura empregando a água de parboilização do arroz como substrato. Após a seleção da cepa e o sequenciamento de dois planejamentos experimentais para a maximização da produção volumétrica da astaxantina pela *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 foi alcançado 5,3 µg/mL, produção específica de astaxantina de 628,8 µg/g, com 9,0 g/L de biomassa, utilizando no meio de cultivo 16,25 g/L de extrato de malte, 8,75 g/L de peptona, 15 g/L de sacarose e 87,5 g/L de água de parboilização do arroz, com pH inicial de 5,0, a 25°C, 150 rpm por 144 h.

Maldonade *et al.* (2008) selecionaram e identificaram leveduras encontradas no Brasil capazes de produzir carotenoides. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de caldo extrato de malte e levedura (YM), e incubado a 25°C durante 5 dias à 200 rpm, sem iluminação. As leveduras pigmentadas (amarelo a vermelho) foram isoladas de amostras de solos, folhas, frutos, flores e alimento processado. Dos 242 micro-organismos isolados, somente 5 apresentaram coloração intensa entre amarelo e vermelho. Os principais pigmentos encontrados nessas leveduras foram toruleno e β-caroteno. O β-caroteno predominou na *Rhodotorula*

graminis-125, *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces roseus*, enquanto que o toruleno foi o principal carotenóide em *Rhodotorula mucilaginosa*. A levedura *R. glutinis* obteve a maior produção volumétrica de carotenoides totais (881 µg/L), seguido por *R. graminis* (594 µg/L), *Rhodotorula mucilaginosa*-137 (590 µg/L), *Rhodotorula mucilaginosa*-108 (562 µg/L) e *Rhodotorula mucilaginosa*-135 (545 µg/L), *Rhodotorula minuta* (168 µg/L) e *S. roseus* alcançaram a menor produção de carotenoides (237 µg/L).

Libkind e Broock (2005) isolaram linhagens de leveduras para a produção de carotenoides consideradas potencialmente interessantes, estudando sulfato de amônia e uréia como fontes de nitrogênio no meio sintético (MMS) e resíduos agroindustriais (melaço, xarope de milho e extrato de malte cru) como fontes de carbono. A produção específica máxima de carotenoides foi 300 µg/g para *Rhodotorula sp.* CRUB 0195, sendo o β-caroteno e toruleno os principais carotenoides encontrados.

Andrade (2003) isolou cinco linhagens de fungos filamentosos (*Mucor circinelloides*, *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella elegans*) no qual foi encontrada a presença de astaxantina e β – caroteno em duas cepas. *M. circinelloides* e *M. javanicus* apresentaram pigmentação após 72 e 48 h de cultivo, respectivamente. *M. javanicus*, apresentou maiores concentrações de astaxantina e β – caroteno, de 19,8 e 13,5 µg/g respectivamente. A cepa de *M. circinelloides* produziu 5,3 e 6,8 µg/g, de astaxantina e β – caroteno, respectivamente. A produção de astaxantina pelo gênero *Mucor* acredita-se que tenha sido reportada pela primeira vez.

3.9 Coprodutos industriais

Devido à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social. É importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para se obter ganho energético a partir de recursos renováveis, que são produzidos em grande quantidade no país (BRINGHENTI, 2007).

O uso de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção, além de minimizar os volumes de rejeitos industriais (NASCIMENTO, 2007). Visando diminuir custos do processo de produção, o

coproduto glicerol, o resíduo da água de parboilização do arroz e o melaço de cana, oriundos respectivamente da produção do biodiesel, do processo de parboilização do arroz e da fabricação do açúcar de cana, foram aproveitados neste trabalho como fontes de carbono, nitrogênio e outros minerais em meios industriais alternativos para produção de carotenoides.

3.9.1 Glicerol

O glicerol (1,2,3 propanotriol ou glicerina) é um poliálcool o qual está presente em diferentes espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos (BRISSON *et al.*, 2001). No entanto, é difícil encontrarmos o glicerol na sua forma “livre” nesses organismos, pois geralmente se encontra como um triglicerídeo combinado como, por exemplo, a ácidos graxos como os ácidos: oléico, palmítico e esteárico. Grandes quantidades de glicerol podem ser encontradas também em óleos ou azeites como o de coco, dendê, soja, algodão e oliva (ARRUDA *et al.*, 2007).

O glicerol foi descoberto por Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva. PASTEUR (1858) também observou sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 - 3,6% do conteúdo de etanol, podendo ser o glicerol o segundo maior produto formado durante a fermentação alcoólica (ARRUDA *et al.*, 2007).

É o principal coproduto obtido durante a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais, e vários micro-organismos podem utilizar naturalmente glicerol como única fonte de carbono podendo ser utilizado como substituto aos tradicionais carboidratos, como glicose, sacarose e amido, em vários cultivos microbianos (SILVA *et al.*, 2009). O glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, correspondendo a aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido (DASARI *et al.*, 2005).

Devido a grande diversidade de óleos vegetais e alta produtividade (soja, mamona, dendê, algodão, pupunha), o Brasil demonstra grande abertura para uma nova alternativa energética no que se refere à substituição do diesel a partir de biocombustível, ou seja, o diesel produzido de óleos vegetais. Uma grande vantagem do biodiesel é sua eficácia como aditivo (de até 20% sem qualquer adaptação para o motor), podendo ser agregado ao diesel de petróleo. Preocupados com a iminência do esgotamento de

reservas de petróleo e em manter o equilíbrio ambiental, governos e corporações passaram a investir cada vez mais na pesquisa de combustíveis mais “limpos”, como alternativa energética; estes combustíveis estão sendo alvo de pesquisas destinadas a torná-los economicamente viável, desta vez substituindo o diesel fóssil pelo biodiesel, nome dado ao “diesel” extraído de óleos vegetais (ARAÚJO, 2002).

Estima-se que com o incremento do volume de biodiesel, o glicerol coproduzido vai aumentar de 83 para 330 milhões L/ano no ano de 2010. Com o intuito de evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerol e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção (RIVALDI *et al.*, 2007).

3.9.2 Água de parboilização de arroz

O arroz parboilizado representa 25% do total de arroz produzido no Brasil, assim como no resto do mundo. A parboilização do arroz é o processo hidrotérmico, no qual o arroz em casca é imerso em água potável, com temperatura superior a 58°C, seguido de gelatinização parcial ou total do amido e de secagem (BRASIL, Portaria nº 269, de 17 de novembro de 1988). Esse processo utiliza aproximadamente 1,12 L de água e gera 0,83 L de efluente por kg de arroz em casca, cujos nutrientes, em especial o nitrogênio e fósforo, poderiam ser aproveitados como proteína unicelular se incorporados em micro-organismos (FARIA, 2006).

O processo de parboilização pode gerar muitos impactos ambientais, principalmente na etapa de encharcamento, causado pela própria temperatura de saída da água da operação, que pode sair do processo em torno de 60°C. Como a concentração de Oxigênio Dissolvido – OD – em um manancial diminui com a elevação da temperatura, ao ser jogado o efluente do processo diretamente em algum rio ou lago ocasiona dano à vida aquática, a começar pelos peixes mais sensíveis; estes, podem servir de importantes indicadores biológicos. Este é um aspecto praticamente equacionado na indústria nacional, seja pela crescente consciência empresarial, ou pela atividade política dos órgãos responsáveis pela preservação do ambiente (AMATO,2002).

3.9.3 Melaço de cana

Melaço é um coproduto da indústria de açúcar e é utilizado como fonte de carbono para alimentação de animais, biofertilizantes e matéria-prima para a indústria de cultivos. Para o uso industrial, o melaço é uma das matérias-primas de menor custo e mais apropriada para cultivos microbianos. Mas a grande concentração de metais pesados é a causa de um problema crítico em sua utilização em cultivos. A presença desses metais pesados inibe o crescimento de micro-organismos, influencia o pH do substrato e está envolvida na inativação de enzimas associadas à biossíntese do produto. Neste contexto, observa-se a importância do estudo de um pré-tratamento de meios de cultura contendo melaço, de forma a clarificar o meio sem provocar prejuízos no cultivo, garantindo maior facilidade na recuperação e purificação de uma enzima de interesse (HERNALSTEENS, 2006).

O melaço de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentescíveis e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio, sendo considerado um bom substrato para o cultivo de bactérias ácido lácticas (FELTRIN, 2000).

Diversos coprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento de micro-organismos, pela alta disponibilidade e baixo custo. Dentre estes, o melaço destaca-se como meio de cultivo nos cultivos microbianos, em virtude do alto teor de açúcares, nitrogênio e vitaminas.

Este coproduto do processo de refino açúcar, possui geralmente de 17 a 25% de água e teor de açúcar (sacarose, glicose e frutose) de 45 a 50% (NAJAFPOUR; SHAN, 2003).

Cerca de 17,9 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil durante a fabricação do açúcar. Devido sua composição rica em açúcares fermentescíveis, seu baixo custo (R\$ 0,15/Kg) e alta disponibilidade no território brasileiro, o melaço de cana-de-açúcar é sugerido como substrato para melhorar e reduzir custos na produção de bioprodutos (HAULY, 2003).

3.10. Produção de carotenoides utilizando coprodutos industriais

Valduga *et al.*, (2007) utilizaram a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 para produção de carotenoides utilizando meios agroindustriais (melaço de cana,

hidrolisado de levedura e água de maceração de milho). Na bioprodução de carotenoides com substratos pré-tratados com carvão ativo, a máxima concentração de carotenoides totais obtida foi de 208,6 µg/L, com concentrações de melado de cana-de-açúcar de 10 g/L, água de maceração de milho de 10 g/L e hidrolisado de levedura de 10 g/L, sendo as condições do cultivo de 180 rpm, 25°C e pH inicial de 4,0 durante 120 h sem iluminação. A otimização da produção de carotenóides em substratos industriais pré-tratados com ácidos (sulfúrico e/ou fosfórico) permitiu obter um teor de carotenóides totais de 541,5 µg/L, com concentrações de melado de cana-de-açúcar de 10 g/L, água de maceração de milho 5 g/L e hidrolisado de levedura de 5 g/L, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Valduga *et al.*, (2008) utilizaram a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 para avaliar a produção de carotenoides, utilizando como meio de cultivo os coprodutos industriais: melado de cana (10 g/L), Prodex Lac[®] (5 g/L) e água de maceração de milho (5 g/L) pré-tratados com carvão ativado, terra diatomácea, ácido sulfúrico e ácido fosfórico. Em Erlenmeyers de 250 mL foram colocados 100 mL de meio de cultivo e incubados em *shaker* orbital a 180 rpm, 25°C durante 120 h com pH inicial de 4,0. Os valores de carotenoides obtidos foram de 502 µg/L em 100 h de cultivo. A bioprodução de carotenóides foi associada ao crescimento celular sendo a relação entre a produção de carotenoides e o crescimento celular ($Y_{P/X}$) de 163 µg/g.

SILVA, (2009) realizou cultivos utilizando a levedura *Phaffia rhodozyma*, estudando diferentes meios de cultura, empregando a água de parboilização do arroz como substrato. Inicialmente selecionou-se dentre 3 cepas de *P. rhodozyma*: NRRL Y-17268, NRRL Y-10921 e NRRL Y-10922, a mais promissora quanto à produção de astaxantina, utilizando glicose e sacarose como fonte de carbono. Os cultivos foram realizados em frascos agitados a 25°C, 150 rpm, por 168 h. Através do acompanhamento da bioprodução de astaxantina, a levedura *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 foi selecionada, pois se destacou como boa produtora do carotenóide, alcançando 7,0 g/L de biomassa, 350,2 µg/g de produção específica de astaxantina e 2,4 µg/mL de produção volumétrica de astaxantina, utilizando sacarose. Um planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{6-2} foi realizado para determinar as variáveis que mais influenciavam na produção da astaxantina. As variáveis independentes estudadas foram concentrações de extrato de levedura (1 a 10 g/L), extrato de malte (1 a 10 g/L), peptona (1 a 10 g/L), sacarose (5 a 20 g/L), efluente da parboilização do arroz (0 a 180 g/L) e o pH inicial do meio (4 a 6), tendo

como resposta a produção de biomassa, produção específica de astaxantina e produção volumétrica de astaxantina. Os valores máximos obtidos foram 8,9 g/L de biomassa, 538,4 µg/g de astaxantina específica e 3,1 µg/mL de astaxantina volumétrica, em diferentes condições de composição de meio de cultivo. O extrato de levedura não apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) em nenhuma das respostas avaliadas, sendo realizado um teste de Tukey na faixa de 0 a 1 g/L não apresentando diferença significativa, sendo retirado do meio de cultivo. No segundo planejamento foram ampliadas as faixas de estudo das variáveis selecionadas: concentrações de extrato de malte (8,75 a 16,25 g/L), sacarose (15 a 35 g/L), peptona (8,75 a 16,25 g/L) e o pH mantido no ponto central 5,0. A partir dos resultados, verificou-se um incremento na concentração máxima de biomassa obtida, alcançando 10,9 g/L e na produção específica de astaxantina para 628,8 µg/g. As melhores condições encontradas através das superfícies de resposta para maximização da produção volumétrica de astaxantina foram: 16,25 g/L de extrato de malte, 8,75 g/L de peptona, 15 g/L de sacarose e 87,5 g/L de água de parboilização do arroz, pH 5,0, a 25°C, 150 rpm por 144 h, alcançando em torno de 5,3 µg/mL.

SILVA, (2010) produziu através de cultivos submersos biomassa rica em carotenóides a partir de *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268 aproveitando a água de parboilização do arroz e o glicerol proveniente respectivamente do processo de parboilização do arroz e obtenção de biodiesel. Num primeiro momento foi avaliada a temperatura e a utilização do coproduto glicerina na produção de carotenóides, os cultivos foram realizados utilizando a levedura *P. rhodozyma*, a 20°C e 25°C, pH inicial do meio 5,0, 150 rpm por 168 h, com os meios contendo 5.5 g/L de extrato de malte, extrato de levedura e glicose, 10 g/L de peptona, 15 g/L de água de parboilização do arroz e glicerol variando nas concentrações de 0, 10 e 40 g/L. A 20°C glicerol P.A. com 0, 10 e 40 g/L foram alcançados máximos de biomassa 3,9, 5,2 e 7,5 g/L, produção específica de carotenóides 201,4, 223,6 e 141,0 µg/g e produção volumétrica de carotenóides 0,9, 1,5 e 1,1 µg/mL, respectivamente. Com o incremento da temperatura para 25°C houve um aumento nas respostas atingindo, nas mesmas concentrações anteriores, máximos de biomassa 3,6, 5,3 e 8,9 g/L, produção específica de carotenóides de 351,7, 317,5 e 391,1 µg/g e produção volumétrica de carotenóides de 1,1, 1,6 e 2,0 µg/mL. A 25°C aproveitando o coproduto glicerina a 10 e 40 g/L foi obtido os máximos de biomassa 5,3 e 8,3 g/L, produção específica de carotenóides de 297,4 e 275,5 µg/g e produção volumétrica de carotenóides de 1,4 e 1,7 µg/mL, respectivamente. Portanto, com o

coproduto glicerina foi possível alcançar produção de carotenóides totais, similar à obtida com o glicerol P.A. Desta maneira foi avaliado os componentes do meio de cultura para a bioprodução de carotenóides, com cultivos realizados a 25°C, 150 rpm por 168 h, utilizando frascos agitados contendo 170 mL de meio de cultura onde a composição variou de acordo com os planejamentos experimentais. O estudo do meio de produção foi realizado através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, onde foi verificada a possibilidade do aproveitamento concomitante do coproduto glicerina e do efluente de parboilização do arroz, obtendo como condições ótimas do meio de cultura de bioprodução de carotenóides em (g/L): 35 glicerol, 7,5 peptona, 6,4 glicose, 90 efluente, 20 extrato de malte, 1 extrato de levedura e pH inicial 4,0, alcançando concentração de biomassa de 13,5 g/L, produção volumétrica e específica de carotenóides, respectivamente 2,4 µg/mL e 176,0 µg/g em 168h.

Existem outros trabalhos que utilizaram coprodutos agroindustriais como substrato para a produção de outros bioprodutos de interesse, como algumas enzimas e biomassa microbiana, os quais estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Utilização de coprodutos agroindustriais para obtenção de bens de interesse

Autor	Micro-organismo	Coproduto utilizado	Produto de interesse
Manera, et.al (2011)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT-7082	Água de maceração de milho, ProdexLac® e soro de queijo	β- galactosidase
Braga, et.al (2011)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC-16045	Água de parboilização de arroz e soro de queijo	β- galactosidase
Ladeira, et.al.(2011)	<i>Bacillus thermophilus</i>	Pectina de maçã, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho	Proteases
Sella, et.al (2009)	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Melaço de soja	Biomassa microbiana
Makino, et.al (2009)	<i>Kluyveromyces</i>	Melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho	Inulinase
Feltrin (2002)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Melaço de cana de açúcar	Biomassa microbiana

Com base no que foi visto na revisão bibliográfica não há uma vasta literatura que enfatize o isolamento de novas cepas de leveduras e o aproveitamento de coprodutos agroindustriais para a produção de carotenóides justificando, portanto o objetivo da realização deste trabalho.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES ATRAVÉS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO
SUL DO BRASIL**

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES ATRAVÉS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO SUL DO BRASIL

OTERO, D. M.; BURKERT, J. F. M.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi isolar cepas de leveduras silvestres produtoras de carotenoides a partir da biodiversidade presente em ecossistemas de interesse no estado do Rio Grande do Sul. Foram coletadas amostras de solos, flores, folhas, cascas de árvores e frutos de dois ecossistemas distintos, Escudo Sul-Rio-Grandense e Litoral Médio. Foram coletadas 147 amostras, totalizando 683 colônias, e a partir delas foram isoladas 65 leveduras com características carotenogênicas. As amostras foram incubadas em meio extrato de malte e levedura (YM) a 30°C por 48h, logo após inoculadas em ágar YM a 30°C por 120h. As colônias que apresentaram características carotenogênicas foram transferidas para ágar YM a 30°C, e reisoladas pelo método de esgotamento por estrias. A bioprodução de carotenoides foi realizada através de cultivos submersos em frascos agitados, com meio de produção YM a pH inicial de 6,0, acrescidos de 1×10^7 células/mL a 25°C, 150rpm por 168h, sendo determinado após este tempo o pH, a biomassa e carotenoides totais. Ao final dos cultivos três leveduras se destacaram frente a bioprodução de corantes, sendo selecionadas e identificadas como *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. A levedura *Sporobolomyces pararoseus* apresentou valores máximos de produção específica de carotenóides de 123,64 µg/g e produção volumétrica de carotenóides de 0,905 µg/mL com 7,32 g/L de biomassa após 168 h de cultivo. Para a levedura *Pichia fermentans* foram alcançados, em 168 h, 54,07 µg/g e 0,640 µg/mL, com 11,84 g/L de biomassa. Para *Rhodotorula mucilaginosa*, ao término do cultivo, foi observado que a produção de carotenoides foi inferior, com valores máximos de 28,06 µg/g e 0,310 µg/mL e 11,18 g/L de biomassa. Os carotenoides identificados foram a luteína, β-criptoxantina e β- caroteno. Assim a levedura que mais se destaca é a *Sporobolomyces pararoseus*, uma vez que a produção de carotenoides foi significativamente superior as demais leveduras isoladas e selecionadas.

Palavras-chave: carotenoides, isolamento, leveduras silvestres.

PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY NEW STRAINS OF YEAST ISOLATED FROM SOUTHERN BRAZIL

OTERO, D. M.; BURKERT, J. F. M.

ABSTRACT

This study was aimed at isolating strains of wild yeasts that produce carotenoids from the biodiversity in ecosystems of interest in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Samples of soil, flowers, leaves, bark and fruits were collected from the city of Caçapava do Sul, which belongs to the Sul Riograndense Shield. The samples were incubated in Yeast and Malt Extract medium (YM) at 30°C for 48 h, and then inoculated in YM agar at 30°C for 120 h. Colonies that showed carotenogenic characteristics were transferred to YM agar at 30°C, and reisolated by streak plate method. The bioproduction of carotenoids was carried out by submerged cultivation in flasks containing the YM production medium at initial pH 6.0 plus concentration of cell 1×10^7 cell/mL, at 25°C, 150 rpm for 168 h. As a result the pH, biomass and total carotenoids were determined. To the end of the cultures three leavenings if had detected front the bioproduction of carotenoids, being that these had been considered of interesting and used throughout the work. Was selected yeasts had been identified as *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* and *Rhodotorula mucilaginosa*. The yeast *Sporobolomyces pararoseus* after presented $\mu\text{g/g}$ and 0,905 123,64 maximum values of carotenoids of $\mu\text{g/mL}$ with 7,32 g/L of biomass in 168 h cultivate. For the *Pichia fermentans* were reached, in 168 h cultivate, 54,07 $\mu\text{g/g}$ and 0,640 $\mu\text{g/mL}$, with 11,84 g/L of biomass. The behavior of the *Rhodotorula mucilaginosa*, to the ending of the culture, was observed that the production of the carotenoids was smaller than others yeast with maximum values of 28,06 $\mu\text{g/g}$ and 0,310 $\mu\text{g/mL}$ in 11,18 g/L of biomass. The identified carotenoids had been luteína, β -criptoxantina and β - carotene. So take tough stands out most is the *Sporobolomyces pararoseus*, since the production of carotenoids was significantly higher than the other yeasts and selected.

Keywords: carotenoids, isolation, wild yeasts.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais devido à larga distribuição, diversidade estrutural e inúmeras funções. São responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelha de frutas, flores, entre outros (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Esses pigmentos são classificados por sua estrutura química em carotenos, que são constituídos por carbono e hidrogênio, e oxicarotenoides ou xantofilas, que possuem carbono, hidrogênio e oxigênio sendo que já foram identificados mais de 600 carotenoides distribuídos em várias formas isoméricas (ALVES, 2005).

As moléculas de carotenoides possuem um sistema de duplas ligações que constitui o grupo cromóforo responsável pela cor que proporcionam aos alimentos. Para que a cor amarelo apareça são necessárias no mínimo sete ligações conjugadas e com o aumento dessas ligações a coloração se aproxima do vermelho (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Além do aspecto pigmentar, esses carotenoides também têm sido adicionados aos alimentos devido às suas atividades biológicas (anticarcinogênica, imunomoduladores, antioxidante, pró-vitamina A) a fim de enriquecer o produto alimentar (MALDONADE, 2003).

Os carotenóides microbianos foram estudados e seu potencial reconhecido durante os anos. A aplicação comercial, entretanto, foi limitada. Nos últimos anos houve um ressurgimento de interesse no uso de fontes microbianas de carotenoides. A razão principal para o interesse na utilização de micro-organismos para produzir os compostos que podem de outra maneira ser isolados das plantas e dos animais ou ser sintetizados são a facilidade de aumentar a produção pela manipulação ambiental e genética. A utilização comercial dos micro-organismos com potencial biotecnológico para produzir carotenóides é limitada principalmente pelo custo de produção elevado (AKSU e EREN, 2005).

O Brasil possui vastos e ricos ecossistemas, os quais apresentam diversas fontes, como flores, frutas, solos, cascas de árvores e folhas, com potencial biotecnológico para isolamento e bioprospecção microbiana visando a produção de bioprodutos de valor agregado. Portanto, o presente estudo tem como objetivo isolar leveduras silvestres com potencial para produção de carotenoides.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Neste estudo foram coletadas as amostras da biodiversidade ambiental contida em solos, flores, folhas e frutos presentes no ecossistema denominado Litoral Médio que abrange as cidades de Barra do Ribeiro, Capivari do Sul, Mostardas, Palmares do Sul, São José do Norte, Tapes, Tavares e Viamão; e no ecossistema do Escudo Sul-Riograndense, que compreende as cidades de Caçapava do Sul, Encruzilhada do Sul, Lavras do Sul, Pinheiro Machado e Santana da Boa Vista, geograficamente próximos a FURG. Para a realização das coletas foram escolhidos ambientes livres de contaminações por automóveis, pessoas ou animais.

2.2 Isolamento das leveduras

As amostras coletadas do meio ambiente foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio Extrato de Malte e Levedura (YM) cuja composição é: 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 30°C por 48 h a 150 rpm, para o enriquecimento microbiano. Após este período foram inoculadas em placas de petri com meio ágar YM a 30°C por 120 h.

As colônias de leveduras que apresentaram coloração entre amarelo e vermelho foram transferidas para tubo de ensaio com meio ágar YM inclinado sendo incubados a 30°C até crescimento satisfatório. Estas leveduras foram reisoladas, pelo método de esgotamento em estrias em placas de petri com meio ágar YM (30°C por 72 h) (VALDUGA, 2005).

2.3 Manutenção das cepas isoladas

As leveduras foram mantidas em tubos de ensaios contendo ágar inclinado GYMP (p/v) com glicose 2,0%, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaHPO₄ 0,2% e ágar 2,0% , com óleo mineral a -18°C (COELHO, 2005).

2.4 Inóculo

Primeiramente as colônias que estavam em óleo mineral foram repicadas em tubos com ágar YM inclinado e incubadas a 25°C durante 48 h, após este período foram adicionados 1 mL de água peptonada estéril e formou-se uma suspensão de células no meio, sendo transferida para tubos de ensaio com 9 mL de caldo YM, sendo mantidos a 25°C por 48 h. Ao término, os cultivos foram homogeneizados e estes foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do caldo YM, previamente esterilizado a 121°C por 15 min, sendo incubado a 150 rpm, 25°C por 48 h ou tempo necessário para concentração celular atingir 10^8 células/mL, contadas através de câmara de Neubauer (VALDUGA, 2005).

2.5 Bioprodução de carotenoides

A bioprodução de carotenoides foi realizada em agitador orbital (Tecnal, TE 424, Brasil) através 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 25°C, 180 rpm por 168 h (SILVA, 2009).

As amostras foram coletadas ao término do cultivo em 168 h para determinação da biomassa através de método gravimétrico, pH e a determinação da concentração de carotenoides totais.



Figura 1: Bioprodução de carotenoides em agitador orbital.

2.5.1 Cinética dos cultivos carotenogênicos com as cepas mais promissoras

Com o objetivo de verificar a cinética de produção de biomassa, consumo de substrato, evolução de pH e produção de carotenoides foram conduzidos cultivos nas mesmas condições do item 2.5 com as cepas mais promissoras quanto à bioprodução de carotenóides. Porém o acompanhamento foi realizado em um intervalo de 4 h nas primeiras 48 h e após este período o acompanhamento foi realizado em intervalos de 12 h até o final.

2.6 Análises estatísticas

Os cultivos foram feitos em triplicatas para cada micro-organismo selecionado, sendo realizada análise de variância e teste de tukey ($p < 0,05$) para indicação das cepas de leveduras silvestres mais promissoras quanto à bioprodução de carotenoides.

2.7 Métodos analíticos

2.7.1 Determinação da concentração de biomassa

Para a seleção das leveduras a avaliação da concentração celular foi determinada pelo método gravimétrico segundo AOAC (1995) após 168 h.

Para as cinéticas de cultivo a concentração celular ao longo da bioprodução do carotenóide foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, onde a conversão da absorbância em biomassa foi realizada utilizando uma curva padrão para cada microrganismo (KUSDIYANTINI, 1998) apresentadas no Apêndice (Figuras 1, 2 e 3).

2.7.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em medidor de pH(Marte, MB-10, Brasil) segundo AOAC (1995).

2.7.3 Recuperação dos carotenoides totais

Para a determinação da concentração de carotenoides totais foi feita ruptura de 0,05 g de células secas (48 h a 35°C) e congeladas (48 h a -18°C) com 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizadas em agitador mecânico (Biomixer, QL-901, Brasil) e deixando a reação ocorrer por 1 h. Após a ruptura foram adicionados 6 mL de acetona para facilitar a extração do carotenóide. A amostra foi centrifugada a 1800 g por 10 min., a fase solvente separada e o procedimento de ruptura repetido, até o branqueamento total da célula. Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases foi feita uma filtração através de sulfato de sódio (Na₂SO₄), e retirada da fase sobrenadante com auxílio de pipeta (AN, 1989). A determinação da concentração de carotenoides totais foi feita em espectrofotômetro (Biospectro, SP 220, China) a 474 nm e o cálculo foi realizado através da Equação 1, utilizando o coeficiente de absorvidade específica de 2100 para éter de petróleo (CHUMPOLKULWONG *et al.*, 1997; DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, TORRES-MUÑOZ, 2004).



Figura 2. Recuperação de carotenóides através do método de ruptura celular.

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

Onde : PEC= µg/g; A = absorvância; V = volume (mL); m_{amostra} = massa celular seca (g);

$A_{1cm}^{1\%}$ =absortividade específica.

Para o cálculo da produção volumétrica de carotenoides totais é realizada uma conversão de unidades utilizando a PEC (µg/g) e a concentração da biomassa (µg/mL).

2.7.4 Determinação da concentração de açúcares totais

A concentração de sacarose medida como açúcares totais foi determinada através do método DNS (MILLER, 1959), modificado por GARDA-BUFFON (2002).

2.8 Identificação das leveduras

A identificação das leveduras foi realizada através da biologia molecular utilizando a técnica de DNA (YARROW, 1998), realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.8.1 Extração de DNA de leveduras

O DNA total das leveduras foi extraído por fenol:clorofórmio: álcool-isoamílico (25:24:1). Por este método, as leveduras, depois de serem crescidas em ágar YM a 25°C por 24 h, foram ressuspensas em 100 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Os tubos, contendo essa suspensão, foram incubados em banho-maria a 65°C por 35 min. Decorrido esse tempo adicionou-se 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) aos tubos e esses foram levados ao Vortex por 3 min. e centrifugados por 15 min. O sobrenadante foi então retirado e transferido para outro tubo, onde foi adicionado 100 µL de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13000 rpm por 3 min. O etanol foi removido e os tubos foram secos por *overnight*. Concluída essa etapa, o DNA foi ressuspensado em 100 µL de TE, e armazenado em freezer a -20°C.

2.8.2 PCR com os iniciadores NL1 e NL4

Um isolado de cada perfil molecular e fisiológico obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA conforme descrito por LACHANCE *et al.* (1999). Para a reação de PCR utilizou-se os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os ensaios foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3 µL de MgCl₂

1,5 mM (MBI Fermentas), 1 μL do iniciador NL1 $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen, EUA), 1 μL do iniciador NL4 $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen, EUA) 0,2 μL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1 μL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50 μL . A reação foi realizada em um termociclador PCR Express (Thermo Hybaid) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 20 s, seguidos de extensão final a 72°C por 10 min..

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

2.8.3 Purificação dos amplicons

Os amplicons (produtos de PCR) obtidos foram purificados mediante técnica com polietilenoglicol (PEG). Inicialmente foi adicionado aos produtos de PCR (v/v) PEG 2% em NaCl 2,5 M e os tubos foram levados ao banho-maria a 37°C por 15 min.. Os tubos foram então centrifugados a 13000 rpm por 15 min. e o sobrenadante retirado. Imediatamente depois adicionou-se 125 μL de etanol 70% gelado aos tubos e esses foram homogeneizados e centrifugados a 13000 rpm por 3 min.. O etanol foi removido e os tubos foram secos por *overnight*. Decorrida essa etapa, o DNA foi ressuspensionado em água deionizada, os tubos levados ao Vortex por 15 s e incubados em banho-maria a 37°C por 15 min.. A dosagem de DNA foi realizada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

2.8.4 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automático MegaBACE™ 1000. Para a análise das sequências, utilizou-se o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0, para a comparação com as sequências já depositadas no GenBank.

2.9 Identificação dos carotenoides

Para a identificação dos carotenoides foi utilizado o extrato obtido da ruptura celular, ao término de 168 h de cultivo, conforme metodologia descrita no item 2.7.4. Os extratos foram evaporados para retirada dos solventes em rotaevaporador e em seguida foram colocados em uma proporção de 30% de metanol para 70% de acetonitrila. As análises foram realizadas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof PhD. Rui Carlos Zambiasi, no Laboratório de Cromatografia da Universidade Federal de Pelotas.

O cromatógrafo consistiu no sistema HPLC-Shimadzu (Japão), com injetor automático, equipado com detector UV-visível, utilizando o comprimento de onda de 450 nm, coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5µm, 4,6mm x 150mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-GODS com fase estacionária de superfície octadecil, ambas localizadas em forno a 25°C. A separação foi efetuada utilizando um sistema de eluição por gradiente de metanol, acetonitrila e acetato de etila (Tabela 1), com um fluxo de 1 mL/min.

Tabela 1: Programa de gradiente de eluição utilizado na separação de carotenoides individuais em amostras ambientais.

Tempo (min.)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0	30	70	0
10	10	80	10
35	5	80	15
40	30	70	0

Solvente A: metanol, Solvente B: acetonitrila, Solvente C : acetato de etila

Para a identificação e quantificação de β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina e licopeno utilizou-se uma curva de padrão, preparada com os padrões cromatográficos correspondentes. O conteúdo total de carotenóides individuais foi expressos em mg/100g de amostra (ZAMBIAZI, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e seleção de micro-organismos carotenogênicos

Foram coletadas 147 amostras ambientais, das quais 42 eram flores, 19 frutos, 35 cascas de árvores, 14 solos e 37 folhas, destas foram isoladas 683 colônias. Porém, apenas as que apresentavam colorações que variavam de amarelo a vermelho foram selecionadas e realizados os reisolamentos. Desta forma foram obtidas 31 colônias com coloração amarela, 24 róseas e 10 que apresentaram coloração laranja, totalizando 65 micro-organismos que foram testados quanto à bioprodução de carotenoides. Os períodos de coleta das amostras estão apresentados na Tabela 2 (apêndice).

Estes 65 micro-organismos estão distribuídos conforme Figura 3, a qual apresenta a fonte de isolamento. Trinta e um micro-organismos foram procedentes de folhas, 14 de cascas de árvores, 10 de flores, 3 de solos e 7 de frutos. Levando em consideração a possibilidade da obtenção de cepas produtoras de carotenoides, todos esses micro-organismos isolados com características desejadas foram testados frente à produção dos biopigmentos.

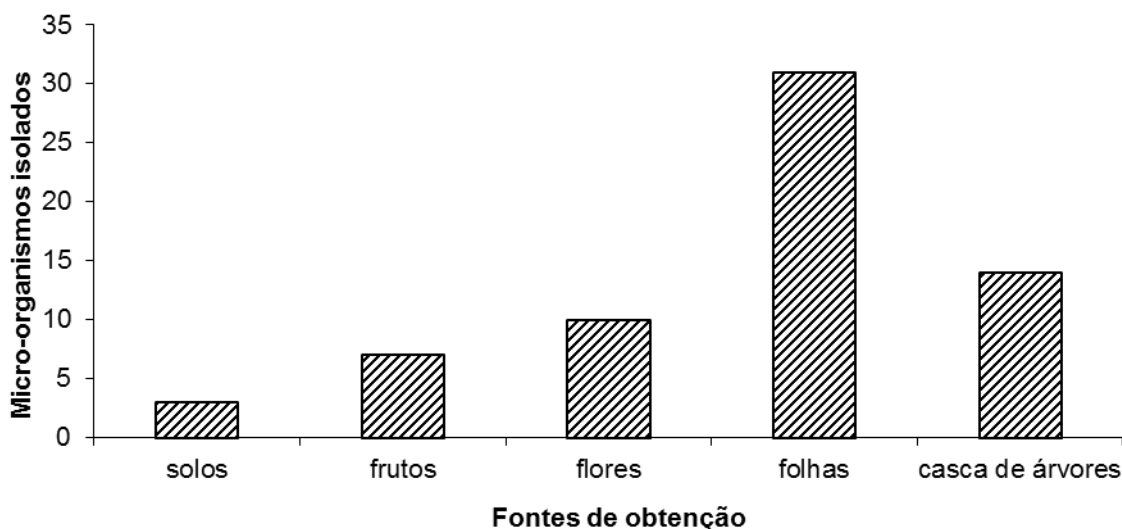


Figura 3: Micro-organismos isolados em cada fonte de obtenção.

Os carotenoides podem ser produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Na literatura a grande maioria dos estudos relacionados a carotenoides enfatizam aspectos da bioprodução tais

como a influência da composição do meio de cultura e condições operacionais, e alguns estudos reportam as informações dos procedimentos de seleção e isolamento de micro-organismos para bioprodução de carotenoides, na busca de alternativas de descobrir novos biocorantes (ZENI, 2009).

Para facilitar a compreensão as leveduras foram codificadas da seguinte forma: Leveduras isoladas de folhas com a letra “A”, de flor com a letra “B”, para as oriundas de solos foi utilizada a letra “C”, “D” para as de cascas de árvores e “E” para as coletadas de frutos. A Tabela 2 apresenta as 65 leveduras já codificadas com as respectivas cidades das coletas, bem como ao Ecossistema pertencente e as respectivas colorações.

Tabela 2: Característica das colônias de leveduras isoladas com coloração amarela, cidade de origem e o ecossistema pertencente.

Código	Cidade da coleta	Ecossistema pertencente
A1, D2	Santana da Boa Vista	Escudo Sul-riograndense
A2, B6, D3	Caçapava do Sul	Escudo Sul-riograndense
A10, A14, A15, B7, D4, D5	Pinheiro Machado	Escudo Sul-riograndense
A12, A16, A21, B9, B11	Viamão	Litoral Médio
A20	Mostardas	Litoral Médio
A23, D12, B12, B13	Tavares	Litoral Médio
A24	Capivari do Sul	Escudo Sul-riograndense
A27	Palmares	Litoral Médio
A28, B8, B10	Lavras do Sul	Litoral Médio
B2, C3	Encruzilhada do Sul	Escudo Sul-riograndense
C6, D6, D7	Barra do Ribeiro	Litoral Médio

A= folha; B= flor; C= solo, D= casca de árvore e E= fruto

Tabela 3: Característica das colônias de leveduras isoladas com coloração laranja, cidade de origem e o ecossistema pertencente.

Código	Cidade da coleta	Ecossistema pertencente
A6	Caçapava do Sul	Escudo Sul-riograndense
A9	Pinheiro Machado	Escudo Sul-riograndense
A13	Barra do Ribeiro	Litoral Médio
A17, A18	São José do Norte	Litoral Médio
A25, A26, D11	Tavares	Litoral Médio
B1	Encruzilhada do Sul	Escudo Sul-riograndense
D1	Santana da Boa Vista	Escudo Sul-riograndense

A= folha; B= flor; C= solo, D= casca de árvore e E= fruto

Tabela 4: Característica das colônias de leveduras isoladas com coloração rósea, cidade de origem e o ecossistema pertencente.

Código	Cidade da coleta	Ecossistema pertencente
A3, A4, A5, A7, A8, B3, B4, B5, C2, C4	Caçapava do Sul	Escudo Sul-riograndense
A11	Pinheiro Machado	Escudo Sul-riograndense
A19, A22	São José do Norte	Litoral Médio
B14, D10, D14	Tavares	Litoral Médio
C1, E1	Santana da Boa Vista	Escudo Sul-riograndense
C5	Lavras do Sul	Escudo Sul-riograndense
D8	Mostardas	Litoral Médio
D9	Capivari do Sul	Escudo Sul-riograndense
E2, E3	Encruzilhada do Sul	Escudo Sul-riograndense
D13	Palmares	Litoral Médio

A= folha; B= flor; C= solo, D= casca de árvore e E= fruto

3.2 Screening dos micro-organismos selecionados para produção de carotenoides

A partir dos micro-organismos isolados apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4 com características carotenogênicas, para a coloração amarela, laranja e rósea,

respectivamente, foram realizados os cultivos e determinados a biomassa, a concentração volumétrica e específica de carotenoides totais e o pH ao final em 168 h. Neste tempo de cultivo foi realizado uma avaliação estatística ($p < 0,05$) para selecionar as leveduras mais promissoras quanto a produção específica de carotenoides em cada coloração característica.

A partir dos micro-organismos isolados com coloração amarela (Tabela 5) pode-se observar que o menor produtor de biomassa foi o B8 com 0,80 g/L de biomassa e o maior produtor foi o micro-organismo codificado como A20, obtendo valores médios de 11,67 g/L. Quanto à produção de carotenóides o micro-organismo D3 superou os demais estatisticamente, com uma produção de 122,82 $\mu\text{g/g}$ e 96 $\mu\text{g-se/L}$. Por outro lado, nos micro-organismos B7, B8, A2 e D6 praticamente não foi detectada produção volumétrica carotenogênica, obtendo-se valores muito inferiores, aproximando-se de zero. Quanto ao pH final do cultivo, o menor pH foi verificado para o B8 com valores médios de 3,96 e o maior pH observado nos meios de cultivo foi de 9,30 para o D4. Portanto o micro-organismo com coloração amarela (D3), foi selecionado como melhor produtor, merecendo destaque devido a sua alta produção de carotenoides específicos. Este micro-organismo foi isolado de cascas de árvores coletada na cidade de Caçapava do Sul.

A partir da Tabela 6 pode-se observar que, dentre os micro-organismos isolados com coloração laranja, os micro-organismos A6 e A17 foram os que apresentaram menor produção volumétrica dos pigmentos, o maior produtor de carotenoides foi o B1 com 25,33 $\mu\text{g/g}$ e 28 $\mu\text{g/L}$. O valor mais baixo de pH foi observado para o A9 com um pH final de 7,79 e os valores mais elevados de pH (9,20) foram observados nos cultivos com o micro-organismo A 13. Para a biomassa o menor valor foi de 1,63 g/L (A6) e o maior produtor foi A18 com 11,53 g/L. Dentre as leveduras de coloração laranja a que foi mais promissora frente à produção de carotenóides foi a B1, a qual foi isolada de flores de Encruzilhada do Sul, cidade pertencente ao Escudo Sul riograndense.

Tabela 5: PEC, biomassa, PVC e pH final (média \pm desvio padrão) dos micro-organismos selecionados com coloração amarela.

Código	Biomassa(g/L)	PEC (μg/g)	PVC (μg/L)	pH final
A1	7,43 \pm 0,15 ^{g,h,i,j}	17,52 \pm 2,96 ^d	14 \pm 0,05 ^d	8,88 \pm 0,05 ^{b,c,d,e}
A2	1,28 \pm 0,24 ^{n,o}	2,76 \pm 0,27 ^{k,l,m,n}	1 \pm 0,01 ^j	7,47 \pm 0,13 ^k
A10	7,00 \pm 0,10 ^{i,j,k}	2,67 \pm 0,33 ^{l,m,n}	2 \pm <0,01 ^{h,i,j}	6,94 \pm 0,36 ^a
A12	9,00 \pm 0,10 ^{d,e,f,g,h}	4,60 \pm 0,15 ^{h,i,j,k,l,m}	4 \pm <0,01 ^{f,g,h,i,j}	9,26 \pm 0,01 ^a
A14	7,13 \pm 0,86 ^{h,i,j,k}	2,88 \pm 0,11 ^{k,l,m,n}	2 \pm <0,01 ^{h,i,j}	9,11 \pm 0,04 ^{a,b}
A15	8,37 \pm 0,83 ^{f,g,h,i,j}	3,52 \pm 0,30 ^{j,k,l,m,n}	3 \pm <0,01 ^{g,h,i,j}	9,10 \pm 0,02 ^{a,b}
A16	4,46 \pm 0,217 ^{l,m}	6,37 \pm 0,08 ^{g,h,i,j,k,l}	3 \pm <0,01 ^{g,h,i,j}	9,15 \pm 0,03 ^{a,b}
A20	11,67 \pm 1,42 ^a	11,15 \pm 0,15 ^{e,f}	13 \pm 0,01 ^d	7,87 \pm 0,01 ^j
A21	8,57 \pm 1,10 ^{i,j,k}	16,02 \pm 0,02 ^{e,f}	14 \pm 0,01 ^d	8,23 \pm 0,09 ^{g,h,i}
A23	7,13 \pm 0,85 ^{h,i,j,k}	7,26 \pm 0,06 ^{f,g,h,i,j}	5 \pm <0,01 ^{f,g,h,i,j}	5,60 \pm <0,01 ^m
A24	8,10 \pm 0,26 ^{f,g,h,i,j}	14,31 \pm 0,27 ^{d,e}	12 \pm <0,01 ^{d,e}	8,18 \pm 0,03 ^{h,i}
A27	2,27 \pm 0,47 ^{n,o}	10,19 \pm 0,12 ^{f,g}	6 \pm <0,01 ^{h,i,j}	8,33 \pm 0,06 ^{g,h,i}
A28	9,20 \pm 0,45 ^{c,d,e,f,g}	6,74 \pm 0,12 ^{g,h,i,j,k}	6 \pm <0,01 ^{f,g,h,i}	8,20 \pm <0,01 ^{g,h,i}
B2	10,80 \pm 0,61 ^{a,b,c,d}	8,47 \pm 1,11 ^{f,g,h}	9 \pm 0,01 ^{d,e,f}	8,48 \pm 0,03 ^{f,g}
B7	8,07 \pm 0,40 ^{f,g,h,i,j}	0,00 \pm <0,01 ⁿ	0 \pm <0,01 ^j	8,65 \pm 0,06 ^{b,c,d,e}
B8	0,80 \pm 0,30 ^o	0,00 \pm <0,01 ⁿ	0 \pm <0,01 ^j	3,96 \pm 0,04 ⁿ
B9	9,53 \pm 0,25 ^{b,c,d,e,f}	1,28 \pm 0,14 ^{m,n}	1 \pm <0,01 ^{i,j}	9,18 \pm 0,03 ^a
B10	9,07 \pm 0,21 ^{d,e,f,g,h}	4,50 \pm 0,13 ^{h,i,j,k,l,m}	4 \pm <0,01 ^{f,g,h,i,j}	8,75 \pm 0,04 ^{d,e,f}
B11	9,07 \pm 0,21 ^{d,e,f,g,h}	7,40 \pm 0,16 ^{f,g,h,i,j}	7 \pm <0,01 ^{e,f,g,h}	9,16 \pm 0,01 ^{a,b}
B12	11,37 \pm 1,06 ^{a,b}	34,29 \pm 0,17 ^b	39 \pm 0,03 ^b	7,81 \pm 0,09 ^j
B13	10,43 \pm 1,10 ^{a,b,c,d,e}	4,20 \pm 0,03 ^{i,j,k,l,m}	4 \pm <0,01 ^{f,g,h,i,j}	8,46 \pm 0,05 ^{f,g,h}
C3	11,07 \pm 0,63 ^{a,b,c}	24,56 \pm 1,89 ^c	27 \pm 0,01 ^c	8,07 \pm 0,03 ^{i,j}
C6	8,73 \pm 0,25 ^{e,f,g,h,i}	2,01 \pm 0,07 ^{m,n}	2 \pm <0,01 ^{h,i,j}	9,13 \pm 0,05 ^{a,b}
D2	9,07 \pm 0,81 ^{d,e,f,g,h}	9,04 \pm 2,21 ^{f,g}	8 \pm 0,02 ^{e,f,g}	8,19 \pm 0,02 ^{g,h,i}
D3	7,87 \pm 0,28 ^{f,g,h,i,j}	122,82 \pm 5,27 ^a	96 \pm 0,05 ^a	7,60 \pm 0,20 ^{e,f}
D4	8,77 \pm 0,32 ^{e,f,g,h,i}	4,53 \pm 0,17 ^{h,i,j,k,l,m}	4 \pm <0,01 ^{f,g,h,i,j}	9,30 \pm 0,03 ^a
D5	2,60 \pm 0,40 ^{m,o}	7,63 \pm 0,38 ^{f,g,h,i}	20 \pm <0,01 ^{h,i,j}	9,04 \pm 0,21 ^{a,b,c,d}
D6	5,32 \pm 0,32 ^{k,l}	1,35 \pm 0,09 ^{m,n}	1 \pm <0,01 ^j	9,05 \pm 0,07 ^{a,b,c}
D7	2,96 \pm 0,09 ^{m,n}	7,70 \pm 0,25 ^{f,g,h,i}	2 \pm <0,01 ^{h,i,j}	8,80 \pm 0,03 ^{c,d,e}
D12	6,53 \pm 0,70 ^{j,k}	7,54 \pm 0,10 ^{f,g,h,i,j}	5 \pm <0,01 ^{f,g,h,i,j}	7,20 \pm <0,01 ^{k,l}

PEC=produção específica de carotenoides; PVC= produção volumétrica de carotenoides; A= folha; B= flor, C= solo, D= casca de árvore e E= fruto; Letras distintas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si (p< 0,05)

Tabela 6: PEC, biomassa, PEC e pH final (média \pm desvio padrão) dos micro-organismos selecionados com coloração laranja.

Código	Biomassa(g/L)	PEC ($\mu\text{g/g}$)	PVC ($\mu\text{g/L}$)	pH final
A6	1,63 \pm 0,25 ^b	2,62 \pm 0,33 ^d	1 \pm <0,01 ^d	8,67 \pm 0,03 ^b
A9	3,9 \pm 0,20 ^f	3,85 \pm 0,73 ^{d,e}	1 \pm <0,01 ^d	7,79 \pm 0,10 ^g
A13	3,81 \pm 0,31 ^f	8,69 \pm 0,18 ^c	3 \pm <0,01 ^e	9,20 \pm 0,01 ^a
A17	8,2 \pm 0,30 ^e	<0,01 \pm <0,01 ^f	1 \pm <0,01 ^d	7,95 \pm 0,01 ^{d,g}
A18	11,53 \pm 0,47 ^c	5,00 \pm 0,10 ^e	6 \pm <0,01 ^c	8,37 \pm 0,03 ^{e,f}
A25	8,33 \pm 0,58 ^e	9,71 \pm 0,18 ^c	8 \pm <0,01 ^b	8,34 \pm 0,08 ^{e,f}
A26	9,83 \pm 0,45 ^d	4,40 \pm 0,15 ^e	4 \pm <0,01 ^{c,e}	8,06 \pm 0,05 ^{c,d}
B1	11,23 \pm 0,06 ^c	25,33 \pm 1,60 ^a	28 \pm 0,02 ^a	8,20 \pm 0,10 ^{c,f}
D1	9,4 \pm 0,53 ^d	3,70 \pm 0,30 ^{d,e}	3 \pm <0,01 ^e	7,83 \pm 0,11 ^g
D11	7,13 \pm 0,15 ^a	7,00 \pm 0,05 ^b	5 \pm <0,01 ^{c,e}	8,50 \pm <0,01 ^{b,e}

PEC=produção específica de carotenoides; PVC= produção volumétrica de carotneoides

A= folha; B= flor, C= solo, D= casca de árvore e E= fruto

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

Dentre os micro-organismos identificados com colônias de coloração rósea (Tabela 7), os micro-organismos E1, D14, B3, B4, C2, C1, A8, A7, A3, A4, D8 e D9 apesar de possuírem coloração característica, não foram capazes de produzir o biopigmento. Por outro lado o A19 merece destaque frente à produção de carotenoides, apresentando 51,30 $\mu\text{g/g}$ e 61 $\mu\text{g/L}$. O micro-organismo A8 além de não apresentar produção de pigmento também obteve o menor crescimento (0,55 g/L), comportamento distinto do D9 que apresentou biomassa de 12,67 g/L. Quanto ao pH, o micro-organismo que apresentou o menor valor foi o D9, tendo 6,96 de pH final e o maior valor foi o D9 tendo como pH final do cultivo 9,20. Assim sendo observa-se que dentre as leveduras com coloração rósea a A19 foi a que apresentou maior capacidade de produção do biopigmento, mesmo sem possuir os maiores valores de biomassa e pH. Esta levedura foi obtida de folhas da cidade de São José do Norte.

Tabela 7: PEC, biomassa, PVC e pH final (média \pm desvio padrão) dos micro-organismos selecionados com coloração rósea.

Código	Biomassa (g/L)	PEC ($\mu\text{g/g}$)	PVC ($\mu\text{g/L}$)	pH final
A3	1,27 \pm 0,21 ⁱ	4,13 \pm 0,60 ^g	1 \pm <0,01 ^g	7,60 \pm 0,14 ^{g,h}
A4	1,73 \pm 0,08 ⁱ	2,55 \pm 0,50 ^{g,h,i}	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	8,60 \pm 0,04 ^{b,c}
A5	1,78 \pm 0,19 ⁱ	26,55 \pm 1,75 ^c	5 \pm <0,01 ^c	8,50 \pm 0,10 ^{b,c,d}
A7	1,17 \pm 0,31 ⁱ	2,67 \pm 0,73 ^{g,h,i}	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	8,87 \pm 0,04 ^b
A8	0,55 \pm 0,15 ⁱ	<0,01 \pm <0,01 ⁱ	1 \pm <0,01 ⁱ	8,71 \pm 0,03 ^{g,h}
A11	6,63 \pm 0,18 ^{g,h}	5,47 \pm 0,21 ^{f,g}	4 \pm <0,01 ^{f,g}	8,29 \pm 0,04 ^{c,d,e}
A19	11,97 \pm 0,25 ^{a,b}	51,30 \pm 0,15 ^a	61 \pm 0,01 ^a	8,36 \pm 0,10 ^{b,c,d,e}
A22	8,13 \pm 1,25 ^{d,e,f,g}	13,26 \pm 0,13 ^d	11 \pm 0,01 ^d	8,38 \pm 0,06 ^{b,c,d}
B3	2,41 \pm 0,30 ⁱ	3,23 \pm 1,80 ^{g,h,i}	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	8,67 \pm 0,04 ^{b,c}
B4	1,70 \pm 0,03 ⁱ	2,52 \pm 0,10 ^{g,h,i}	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	7,96 \pm 0,23 ^{e,f,g}
B5	1,36 \pm 0,26 ⁱ	42,27 \pm 3,16 ^b	6 \pm 0,01 ^b	8,40 \pm 0,02 ^{b,c,d}
B14	10,67 \pm 0,73 ^{a,b,c}	10,03 \pm 0,05 ^{d,e}	11 \pm <0,01 ^{d,e}	8,56 \pm 0,05 ^{b,c}
C1	7,33 \pm 0,85 ^{f,g}	<0,01 \pm <0,01 ⁱ	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	8,08 \pm 0,02 ^{d,e,f}
C2	6,30 \pm 1,08 ^{g,h}	0,52 \pm 0,11 ^{h,i}	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	7,27 \pm 0,41 ^{h,i}
C4	2,313 \pm 0,49 ⁱ	28,17 \pm 0,52 ^{f,g}	25 \pm <0,01 ^{f,g}	8,59 \pm 0,08 ^{b,c}
C5	9,97 \pm 1,51 ^{b,c,d,e}	5,51 \pm 0,14 ^{f,g}	5 \pm <0,01 ^{f,g}	9,20 \pm 0,06 ^a
D8	8,30 \pm 1,24 ^{d,e,f,g}	2,40 \pm 0,23 ^{g,h,i}	2 \pm <0,01 ^{g,h,i}	8,72 \pm 0,05 ^b
D9	12,67 \pm 0,60 ^a	2,32 \pm 0,06 ^{g,h,i}	3 \pm <0,01 ^{g,h,i}	6,96 \pm 0,23 ⁱ
D10	4,77 \pm 0,85 ^h	5,66 \pm 0,06 ^{f,g}	3 \pm <0,01 ^{f,g}	8,40 \pm <0,01 ^{b,c,d}
D13	7,57 \pm 1,12 ^{f,g}	8,16 \pm 0,04 ^{e,f}	6 \pm <0,01 ^{e,f}	8,70 \pm <0,01 ^{b,c}
D14	1,53 \pm 0,15 ⁱ	3,60 \pm 0,08 ^{g,h}	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	8,40 \pm <0,01 ^{b,c,d}
E1	9,07 \pm 1,00 ^{c,d,e,f}	0,40 \pm 0,05 ^{h,i}	1 \pm <0,01 ^{g,h,i}	7,96 \pm 0,02 ^{e,f,g}
E2	7,97 \pm 0,91 ^{e,f,g}	5,26 \pm 1,81 ^g	3 \pm <0,01 ^g	8,64 \pm 0,01 ^{b,c}
E3	10,33 \pm 0,55 ^{b,c,d}	9,88 \pm 1,11 ^{d,e}	38 \pm 0,05 ^{d,e}	7,81 \pm 0,17 ^{f,g}

PEC= produção específica de carotenoides; PVC= produção volumétrica de carotenoides

A= folha; B= flor; C= solo; D= casca de árvore e E= fruto

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

3.3 Seleção e identificação das leveduras

Foram selecionadas 3 leveduras, uma de cada coloração buscando carotenoides diferentes, sendo: a levedura D3 de coloração amarela, com coloração rósea a A19 e para a coloração laranja foi selecionada a B1. Estas leveduras foram selecionadas por serem as mais promissoras frente a produção de carotenoides específicos de cada coloração. Para estes micro-organismos selecionados foram realizadas as cinéticas de bioprodução de carotenóides, a identificação do gênero e espécie, bem como a identificação dos principais carotenoides produzidos.

3.3.1 Identificação das leveduras

As leveduras mais promissoras frente a produção de carotenoides, a D3 de coloração amarela, B1 de coloração laranja e A19 apresentando cor rósea foram identificadas.

A levedura de coloração amarela (D3) foi identificada como *Sporobolomyces pararoseus*, através de placas de sequenciamento de DNA tendo como resultados do BLASTn:

EU003454 (número de acesso da sequencia no GenBank) *Sporobolomyces pararoseus* strain CBS 499 26S ribosomal RNA gene

Length=569

Score = 605 bits (670),

Expect = 7e-170

Identities = 384/402 (96%),

Gaps = 12/402 (2%)

```
GCNTAATCTGGTGATCTTCGACGTCCGAGTTGTAATCATCGAAGAAAGATGTTACCAG
TGATAGACCCGCATACAAGTCTACTTGGAACAGAGCGTCATAGTGGTGAGAACCCAGT
ACACGAATGCGGATGCCTATTACTTTGTGATACACTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC
GATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAC
CAGTACGTGACAATTGTTGGAAGGGAAACACATGCAGTGATACTTGCTATTCGGGGC
AACTCGATTGGCAGGCCCGCATCAGTTCATTCGGGGCGGAACAATCGTAGAGCA
GAAGGTCA
```

Também foi identificada a levedura B1, com coloração laranja, a qual foi descrita como sendo *Rhodotorula mucilaginosa*. Para esta identificação foram utilizados os resultados abaixo do BLASTn :

EF174505 (número de acesso da sequência no GenBank) *Rhodotorula mucilaginosa* strain CRUB 1134 26S ribosomal RNA gene

Length=582

Score = 975 bits (1080)

Expect = 0.0

Identities = 551/556 (99%),

Gaps = 2/556 (0%)

```
GATCCCTAGTACCGGGATNGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTC
GGTGTCCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGT
TGAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCGTATATGGTGCGGACGCCAGCGCT
TTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTA
AATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGG
GAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGG
AAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTT
TTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTC
TGCTGGATACATCTTGGGGGACTGAGGAACGCAGGTGTGCCTTTGGCGGGGGTTTC
GACCTCTTCACACTTAGGATGCTGGTGGAATGGCTTTAAACGA
```

A levedura A19, com características rósea, foi identificada como sendo *Pichia fermentans*, onde os resultados do BLASTn estão apresentados abaixo:

GQ458040.1 (número de acesso da sequência no GenBank) *Pichia fermentans* strain ATCC 10651 18S ribosomal RNA gene,

Length=3217

Score = 645 bits (714)

Expect = 0.0

Identities = 401/422 (96%)

Gaps = 8/422 (1%)

CANGANCGCCGGCCANGANGGGCAGCGGGTGCGCACGCTCCCATGTCCGGGCCGCA
ATAACCTTTCCTTTCAACAATTTACGCTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGGTGCTTTTC
ATCTTTCCTTACAGTACTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAGTATTTAAGCCTTAGAT
GGAATTTACCANCCGCTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTCAGAAGGGC
CTCAGAGCNNTAGGCAAACGGNCCCACGGGGCTCTNAACCTCAATGGCGCCCTGTT
CCAAGGGACTTGGACCGGGCGGCGCCGGCAGAGGGCGCCAACCTGCAATTCACAACCT
GCCGAAGCGATTCCAAATCTGAGCTTTTGCCGCGTTCACTCGCCGCTACTGGGGCAA
TCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGC

As leveduras isoladas neste trabalho (*Sporobolomyces pararoseus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia fermentans*) já haviam sido apresentadas em alguns estudos, que realizaram isolamentos de leveduras, como sendo potenciais produtoras dos pigmentos carotenogênicos.

Oliveira (1980) isolou leveduras presentes em flores e frutos e observou que dentre as 49 espécies analisadas, 80% eram fermentativas, e entre elas a espécie *Rhodotorula*. ROBBS (1986) também observou a presença predominante de leveduras dos gêneros *Rhodotorula sp* em flores e frutos de ecossistemas brasileiros.

Ivo (1982) realizou um estudo com frutas e isolou de abacaxis 99 amostras de leveduras. Dentre elas foram isoladas leveduras e identificadas como sendo do gênero *Pichia*.

Aksu (2007) isolou uma levedura vermelha de solo identificada como *Rhodotorula* a qual foi capaz de produzir 125 mg/L de carotenoides totais.

Maldonade (2008) selecionou leveduras encontradas na cidade de Campinas (isoladas de amostras de solos, folhas, frutos, flores e alimento processado.) capazes de produzir carotenoides. Dos 242 micro-organismos isolados, somente 5 apresentaram coloração intensa entre amarelo e vermelho, identificados como β -caroteno e toruleno. Os maiores valores para produção volumétrica de carotenoides totais foram 0,881 $\mu\text{g/mL}$ e 0,594 $\mu\text{g/mL}$, por outro lado os menores valores encontrados para produção volumétrica de carotenoides totais foram 0,168 $\mu\text{g/mL}$ e 0,237 $\mu\text{g/mL}$.

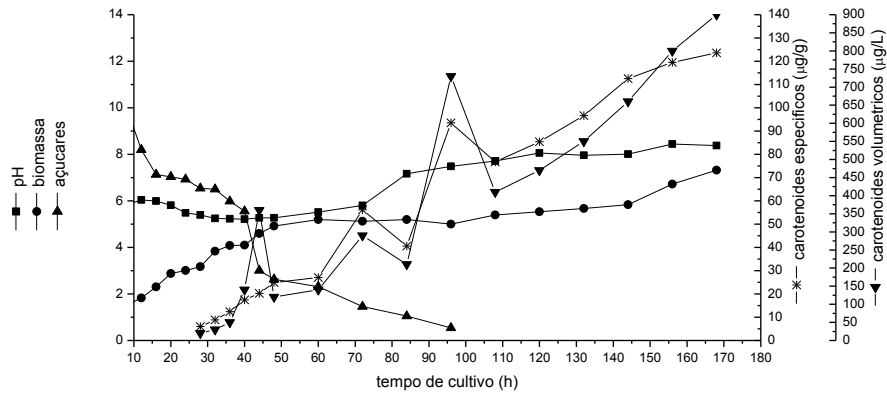
Os trabalhos que referenciam estudos sobre isolamento, seleção e identificação de micro-organismos produtores de pigmentos ainda são poucos. Zeni (2009) realizou um

screening de micro-organismos em frutas, chás, solos de videiras, produtos alimentícios processados em decomposição e amostras de farinha de trigo. Destas foram isolados um total de 116 micro-organismos, no qual 16 eram leveduras. Três micro-organismos (W8, K1 e B7) demonstraram grande potencial para produção de carotenoides com pigmentação predominantemente rósea alcançando uma produção volumétrica de carotenoides totais de 0,818, 0,707 e 0,730 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente já para a produção de carotenoides específicos os valores obtidos foram de 201,6 $\mu\text{g/g}$, 98,90 $\mu\text{g/g}$ e 216,36 $\mu\text{g/g}$. Entretanto, os maiores produtores de carotenoides possuíam coloração predominantemente amarela, e foram codificados como W1, Q3 e B3 com valores que variaram entre 1,063 a 2,563 $\mu\text{g/mL}$ e 238,3 $\mu\text{g/g}$ a 2309,9 $\mu\text{g/g}$.

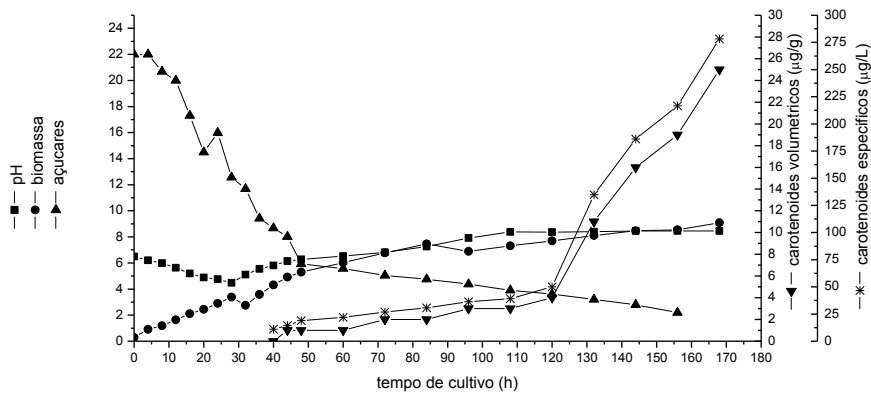
Pinotti (2010) realizou estudos sobre a diversidade de leveduras em plantas de agricultura orgânica onde coletou inicialmente 60 amostras de folhas saudáveis de milho, café, abacaxi, alface, limão, cana de açúcar, arroz, mandioca, cultivados no sistema orgânico. Destas, 36 amostras apresentaram a presença de leveduras, totalizando 226 colônias isoladas. Algumas amostras destacaram-se pela presença de leveduras produtoras de pigmentos carotenogênicos identificadas como *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces*.

3.3.2 Cinética da bioprodução com os micro-organismos selecionados

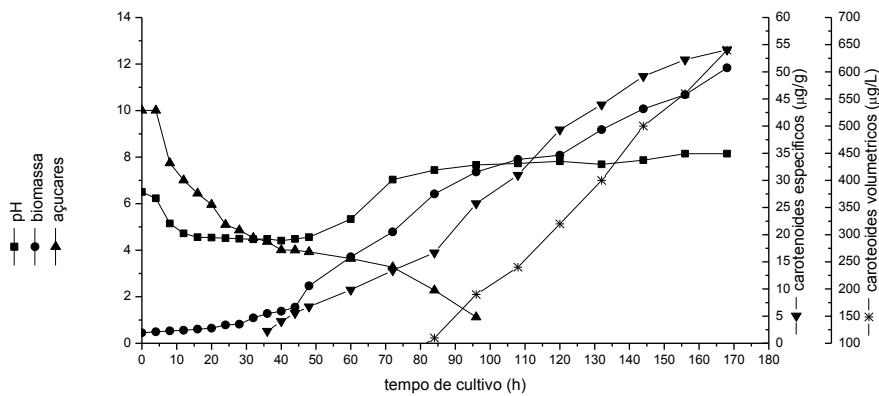
As leveduras selecionadas foram submetidas a acompanhamento cinético onde foram avaliados o pH, produção de biomassa, consumo de açúcares do meio, produção específica e volumétrica de carotenóides, conforme apresentado na Figura 4..



(a)



(b)



(c)

Figura 4: Cinética de crescimento da levedura *Sporobolomyces pararoseus* (a), *Rhodotorula mucilaginosa* (b), *Pichia fermentans* (c) e consumo de substrato, produção de carotenoides e evolução do pH em meio YM.

Ao observar a Figura 4(a) percebe-se que o consumo de açúcares do meio pela levedura foi bastante significativo, uma vez que inicialmente havia 11,67 g/L de açúcares e após 100 h de cultivo este substrato havia praticamente se esgotado. A produção de carotenoides iniciou após 28 h com 5,96 µg/g, neste tempo o açúcar disponível havia caído quase 50% (6,54 g/L), o pH do meio era de 5,39 e a produção de biomassa de 3,17 g/L. A biomassa apresentou uma curva característica, onde até 60 h de cultivo a concentração celular aumentou, em seguida se manteve sem aumentos bruscos até 100 h e a partir deste ponto ocorreu aumento na produção de carotenoides, alcançando em 168 h, o máximo de 123,64 µg/g e 905 µg/L, com pH final de 8,38 e a produção de biomassa de 7,32 g/L.

No meio de cultivo estavam disponíveis 10,60 g/L de açúcares que apresentou uma queda em 40 h de quase 52 %, e ao término do cultivo ainda restaram 2,24 g/L evidenciando para esta levedura que o consumo de açúcares ocorreu de forma mais lenta quando comparada com a levedura *Sporobomomyces pararoseus*. O pH do meio aumentou de 6,04 (0 h) para 8,02 (168 h). A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* não foi capaz de sintetizar carotenoides antes de 72 h de cultivo, a partir deste ponto a produção iniciou em 3,80 µg/g e 0,01 µg/mL. Este comportamento mais lento de produção de corantes observado para esta levedura pode estar relacionado à composição do meio ou pode ser característico do próprio metabolismo da cepa. A produção de biomassa ocorreu de forma crescente ao longo de todo o processo (168 h), alcançando ao término de 11,18 g/L. Essa produção está parcialmente associada a bioprodução dos pigmentos uma vez que quando ocorre a maior produção de biomassa também encontra-se a os maiores valores de carotenoides específicos (28,06 µg/g) enquanto que os carotenoides volumétrico foram de 310 µg/L.

Na Figura 4 (c) verifica-se que a levedura *Pichia fermentans* foi capaz de consumir todo o substrato disponível no meio de cultivo, uma vez que inicialmente haviam 10,01 g/L e após 100 h este já havia sido totalmente consumido. Os valores iniciais apresentados no processo foram de 6,50 para o pH, onde nas primeiras 50 h ocorreu um decréscimo alcançando 4,41 em 40 h e seu máximo foi alcançado a partir das 156 h de cultivo. Essa característica de mudança no pH é provavelmente devido ao fato da levedura excretar um intermediário carbônico durante o crescimento, por exemplo ácido acético, álcool ou intermediário do ciclo do ácido cítrico, ocasionando a queda no pH. Esse intermediário é posteriormente

reassimilado e estimula uma intensa carotenogênese, que resultará no aumento do pH. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final do cultivo (BONFIM, 1999; ZENI, 2009). A biomassa aumentou gradativamente durante as 168 h atingindo 11,84 g/L. Neste ponto também. A produção de carotenóides iniciou em 36 h de cultivo com 2,25 µg/g alcançando o máximo em 168 h, tendo atingido valores de 54,07 µg/g e 640 µg/L . Portanto, pode-se perceber que a produção do biopigmento foi associada ao crescimento.

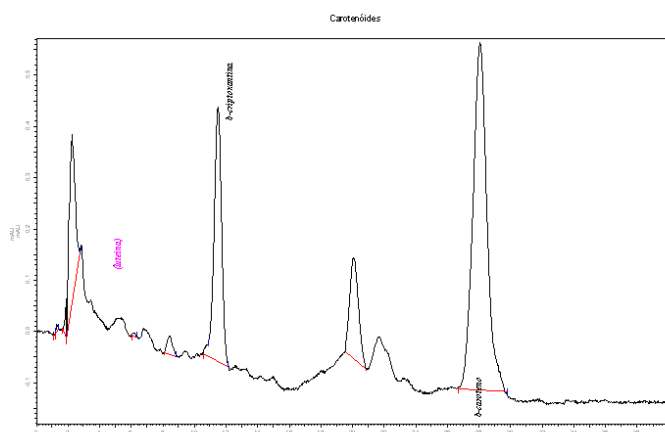
3.3.3 Identificação dos carotenóides produzidos pelas leveduras selecionadas

Foram identificados 3 carotenóides produzidos pelas leveduras, sendo luteína, β-criptoxantina e β-caroteno. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 5 .

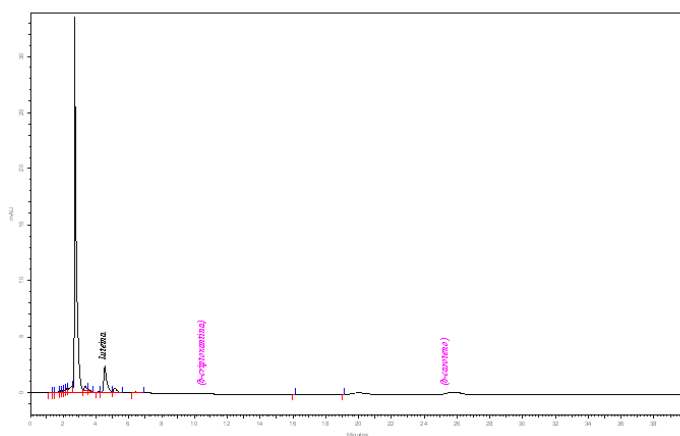
A *Sporobolomyces pararoseus* foi produtora dos carotenóides luteína, β-criptoxantina e β-caroteno. O maior pico observado foi o do β-caroteno, indicando que este é o carotenóide que mais foi produzido pela levedura, dentre os que foram identificados. O tempo de retenção para o β-caroteno é de 28 min., no cromatograma o pico do carotenóide encontra-se em 28,08 min., estando dentro do esperado. A luteína apresenta seu pico um pouco adiantado, o que interfere na detecção, pois o tempo de retenção da luteína é de 4,4 min. e neste caso o pico ocorreu em seguida dos 2 min.

Rhodotorula mucilaginosa teve a luteína apresentada como sendo o carotenóide produzido em maior quantidade. A luteína apresenta seu pico em um tempo de retenção cerca de 4 min. de corrida, indicando que a mesma foi detectada dentro do esperado (tempo de retenção de 4,4 min.). Os demais carotenóides não foram possíveis de detectar, o que sugere que não estão presentes.

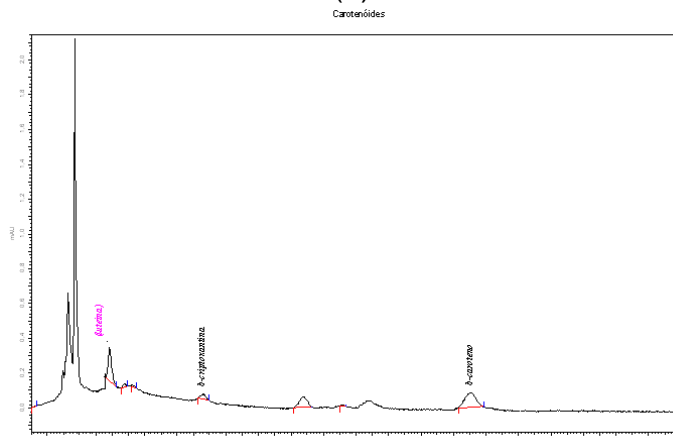
Através da Figura 5 (c) observa-se que os três carotenóides (luteína, β-criptoxantina e β-caroteno) foram produzidos pela levedura *Pichia fermentans*, embora a luteína tenha saído um pouco antes do esperado, ela se apresenta como sendo o carotenóide em maior concentração; observa-se também a presença de um pico no tempo de 16,08 min., provavelmente esse carotenóide pode ser a perlagonidina, pois o tempo de retenção (15,6 min) se aproxima do tempo do pico encontrado.



(a)



(b)



(c)

Figura 5: Cromatogramas dos carotenoides produzidos pelas leveduras (a) *Sporobolomyces paroseus*, (b) *Rhodotorula mucilaginosa* e (c) *Pichia fermentans*.

4.CONCLUSÃO

A partir de 147 amostras ambientais coletadas de solos, cascas de árvores, flores, frutas e folhas dos ecossistemas Escudo Sul Riograndense e Litoral Médio, foram isoladas 65 colônias de leveduras com características carotenogênicas, das quais foram selecionadas três.

A levedura amarela identificada como *Sporobolomyces pararoseus* apresentou valores máximos de carotenóides de 123,64 µg/g e 905 µg/L, 7,32 g/L de biomassa, consumindo 100% do açúcar disponível para a cultivo (11,67 g/L), após 168 h. Esta levedura produziu os carotenoides identificados como luteína, β-criptoxantina e β-caroteno.

Pichia fermentans de coloração rosa, produziu os mesmos carotenoides que o micro-organismo anterior (luteína, β-criptoxantina e β-caroteno), alcançando em 168 h de cultivo 54,07 µg/g e 640 µg/L de carotenoides, concentração celular de 11,84 g/L, com o açúcar disponível inicialmente (10,01 g/L) totalmente consumido em 96 h.

A levedura laranja identificada como *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou comportamento distinto das demais leveduras frente ao consumo de substrato consumindo cerca de 80% dos açúcares. A produção do carotenoide foi inferior, com 28,06 µg/g e 310 µg/L, 11,18 g/L de biomassa após 168 h. Para esta levedura foi identificado a presença da produção somente da luteína.

Com isso conclui-se que os Ecossistemas do Rio Grande do Sul, em estudo, através de amostras ambientais (flores, folhas, solo, frutos e cascas de árvores) são fontes de obtenção de leveduras com potencial carotenogênico, tendo sido isoladas três oriundas de casca de árvore, folha e flor, merecendo destaque para a *Sporobolomyces pararoseus*.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. W. **Extração de corantes de urucum por processos adsortivos utilizando argilas comerciais e *Colloidal gas aphrons***. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

AN, G.-H., SCHUMAN, D. II., AND JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55, 116-124, 1989.

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

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast of *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p.2985 – 2991, 2005.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35 p. 107-113, 2007.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. Tese (PhD Thesis) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

COELHO, A.R. **Controle de *penicillium expansum* / biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita**. Tese. Universidade Federal do Paraná, Brasil. 2005

CHUMPOLKULWONG, N.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S.; NISHIO, N. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v.83, n.5, p.429-434, 1997.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.66, p.249-252, 2004.

GARDA-BUFFON, J. **Micotoxinas em cerveja: metodologia, ocorrência e influência nos processos fermentativos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

IVO, M. I. **Leveduras do abacaxi**. Dissertação, Escola Paulista de Medicina, São Paulo. 1982.

KUSDIYANTINI E., GAUDIN P., GOMA G., BLANC P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnomology Letters**. v. 20, nº 10, 1998.

LANCETTE, G. A. TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTTOESSER, D. F. (Ed). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, p. 533-550, 1992.

MALDONADE, I.R. **Produção de carotenóides por leveduras**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, R. P. Carotenoids of yeast isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v.170, p.145-150. 2008

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

MELENDÉZ-MARTINEZ, A.J.;VICARIO, I.M.; HEREIDA, F.J. Importância nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, vol.54, n2, p.149-155. 2004.

OLIVEIRA, R. B. de. **Taxonomia de leveduras associadas com cajus e mangas**. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1980.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. 1ª edição; São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 155p., 2004.

ROBBS, P.G. **Ecologia e taxonomia de leveduras em uma plantação de abacaxi do estado do Rio de Janeiro**. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1986.

PINOTTI, T. **Diversidade de leveduras endofíticas em plantas de agricultura orgânica (Seropedica - RJ) e sua produção de micocinas e proteases**. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2010

SILVA, D.A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz**. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2009.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2005.

YARROW, D. **Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts**. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed). *The Yeasts: a taxonomic study*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier Publs. B.V., p.77-100, 1998.

ZAMBIAZI, R. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability**. Manitoba/Canadá, 1997. 304 f. Thesis (Doctor of Philosophy), Food and Nutritional Sciences Interdepartmental Program, University of Manitoba.

ZENI, J. **Screening de micro-organismos produtores de carotenoides e poligalacturonases**. Dissertação. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus de Erechim, Erechim - Rio Grande do Sul, 2008.

ARTIGO 2

**APROVEITAMENTO DE COPRODUTOS INDUSTRIAIS NA BIOPRODUÇÃO DE
CAROTENOIDES**

APROVEITAMENTO DE COPRODUTOS INDUSTRIAIS NA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES

OTERO, D. M; BURKERT, J. F. M.

RESUMO

O custo da produção de carotenoides através do cultivo pode ser minimizado aperfeiçoando seu processo, ou usando coprodutos industriais de menor custo como fontes nutrientes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi utilizar as cepas de leveduras com características carotenogênicas mais promissoras isoladas previamente para investigar o aproveitamento de diferentes coprodutos e resíduos agroindustriais como substratos alternativos na bioprodução de carotenoides. A bioprodução de carotenoides foi realizada através de cultivos submersos em frascos agitados, com meio de produção YM a pH inicial de 6,0, acrescidos de uma concentração celular de 1×10^7 células/mL a 25°C, 150 rpm por 168 h, acompanhando pH, biomassa e carotenoides totais. Os coprodutos utilizados foram glicerol, melaço de cana e água de parboilização de arroz como fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultivo visando uma minimização dos custos e valoração destes coprodutos na bioprodução de carotenoides. Os resultados da bioprodução de carotenoides para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* e *Pichia fermentans* foram superiores no meio YM, 123,64 µg/g e 54,07 µg/g, respectivamente. Porém, a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* teve sua máxima produção de 30,16 µg/g do biocorante no meio contendo melaço e água de parboilização de arroz. A *Sporobolomyces pararoseus* apresentou os maiores valores de $Y_{P/X}$ independente do meio estudado. A *Sporobolomyces pararoseus* apresentou os maiores valores de $Y_{P/X}$ de 19,56 µg/g para o YM, 7,89 µg/g para o meio contendo água de parboilização de arroz e glicerol e 10,94 µg/g para o meio contendo água de parboilização e melaço de cana. O meio YM permitiu a obtenção das maiores produtividades do produto de interesse (carotenoides) tanto para *Sporobolomyces pararoseus* quanto para *Pichia fermentans* porém o mesmo não ocorreu para *Rhodotorula mucilaginosa* que alcançou valores mais elevados dos bioprodutos em meio contendo água de parboilização e melaço. Frente a produção de carotenoides utilizando co-produtos agroindustriais merece destaque o meio contendo água de parboilização de arroz e melaço utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

Palavras-chave: biopigmentos, substratos agroindustrias, leveduras

UTILIZATION OF INDUSTRIAL COPRODUCTS IN THE CAROTENOIDS BIOPRODUCTION

OTERO, D. M.; BURKERT, J. F. M.

ABSTRACT

The cost of the production of carotenoids through the culture can be minimized perfecting its process, or using agroindustrials medians of lesser cost as nutrient sources for the culture of microorganisms. In such a way, the objective of this work was to use strains of yeast isolated more promising with carotenogenics characteristics in previous studies to investigate the agroindustrial exploitation of different residues agroindustrials as alternative substrate in the bioproduction of carotenoids. The bioproduction of carotenoids was carried through through submerged cultives in agitated bottles, with means of production YM pH initial of 6,0, increased of a cellular concentration of 1×10^7 cell/mL 25°C, 150 rpm for 168h, following pH, total biomass and carotenoids. The used coprodutos had been glicerol, molasses of sugar cane and wastewater of rice as source of carbon and nitrogen in the way of culture aiming at a minimization them costs and valuation of these substrates industrial in the bioproduction of carotenoids. The results of the bioproduction of biopigments for the yeast *Sporobolomyces pararoseus* and *Pichia fermentans* had been bigger in the half YM (123,64 µg/g and 54,07 µg/g respectively) however yeast *Rhodotorula mucilaginosa* had its maximum production (30,16 µg/g) of the carotenoids in the way contend sugar cane molasses and rice parboilization wastewater,. The *Sporobolomyces pararoseus* presented the biggest values of $Y_{P/X}$ of 19,56 µg/g for the YM, 7,89 µg/g for the way and the 10,94 µg/g for the half B. The half YM allowed the attainment of the biggest productividades of the product of interest (carotenoids) for *Sporobolomyces pararoseus* in such a way how much for *Pichia fermentans* however the same did not occur for *Rhodotorula mucilaginosa* that it reached higher values of the bioproducts in way contend rice parboilization wastewater and sugar cane molasses. Faced with production of carotenoids using agro-industrial by-products is notable for containing rice parboilization wastewater and molasses using yeast *Rhodotorula mucilaginosa*.

Key-words: biopigments, substrates agroindustrials, yeast.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides, amplamente distribuídos entre vegetais, animais e micro-organismos, compreendem a maior classe de pigmentos naturais responsáveis pela grande variedade de cores na natureza. Apresentam grande diversidade estrutural e funcional, sendo utilizados principalmente como corantes e agentes antioxidantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e de rações para nutrição animal. (NASCIMENTO, 2009). Alguns carotenoides são capazes de serem convertidos em vitamina A e como tal desempenham um importante papel nutricional (SILVA e MERCADANTE, 2002).

As plantas são a maior fonte de carotenoides, os quais são responsáveis por conferir as cores características de frutas, como morango, laranja e maracujá, respondendo ainda pelas cores de alguns pássaros. Os carotenoides também se encontram em micro-organismos, nos quais são sintetizados pela rota metabólica dos isoprenóides. Aproximadamente 80 carotenoides diferentes são sintetizados por bactérias fotossintéticas, alguns fungos filamentosos, algas e leveduras (UENOJO, 2007).

Em formulações comerciais, os carotenoides utilizados podem ser de dois tipos: extratos naturais e corantes sintéticos idênticos aos naturais. A grande demanda gerada pelas indústrias e a crescente procura por produtos naturais, tem resultado em um aumento nas pesquisas referentes à produção de carotenoides por via microbiana (TATSCH, 2008).

Devido à biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social (BRINGHENTI, 2007). É importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para aproveitar estes resíduos que são produzidos em grande quantidade no país.

O uso de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção, além de minimizar os volumes de rejeitos industriais (NASCIMENTO, 2007).

As leveduras destacam-se pela capacidade de crescimento e produção a partir de diferentes coprodutos e resíduos agroindustriais utilizados como substratos, como glicerol oriundo da produção do biodiesel, melaço de cana-de-açúcar e água de parboilização do

arroz, tornando-as promissoras para bioprodução industrial de carotenoides visando à minimização dos custos com o meio de produção e agregando valor a estes coprodutos industriais utilizados como substratos.

A utilização de resíduos industriais tem tido grande interesse de estudo devido ao apelo ecológico e econômico, além de uma ampla aplicação, portanto requerendo em alguns casos, pré tratamentos como a clarificação que viabilizem não só a obtenção dos produtos, mas também as etapas de recuperação e purificação sem aumento excessivo no custo do processo (VALDUGA *et al.*, 2007).

A proposta do presente trabalho objetivou utilizar coprodutos e resíduos agroindustriais como substratos alternativos, na bioprodução de carotenoides obtidos por leveduras silvestres isoladas em estudos anteriores, buscando minimizar os custos do processo de produção dos biopigmentos, agregar valor aos coprodutos e diminuir o impacto ambiental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram as leveduras isoladas, selecionadas e identificadas no trabalho anterior, sendo: *Sporobolomyces pararoseus*, *Rodothorula mucilaginosa*, *Pichia fermentans*. As leveduras isoladas e selecionadas anteriormente foram mantidas em tubos de ensaios contendo ágar GYMP (glicose 2,0 %, extrato de malte 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaHPO₄ 0,2% e ágar 1,8%) inclinado com óleo mineral sob refrigeração (COELHO, 2005).

2.2 Substratos alternativos

Os coprodutos industriais a serem utilizados neste trabalho foram: o glicerol, oriundo do processo de obtenção do biodiesel que foi obtido da BSBios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A da cidade de Passo Fundo (RS); a água de parboilização do arroz que foi doada pela indústria beneficiadora de arroz (Nelson Wendt) da cidade de Pelotas (RS) e o melaço de cana-de foi doado pela empresa Guimarães Indústria e Comércio Ltda da cidade de Portão (RS).

2.2.1 Caracterização parcial dos substratos dos meios de cultivo

As determinações de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram realizadas com o analisador Elementar CHNS/O (Modelo 2400, Perkin Elmer, Alemanha). Para a calibração do equipamento foi utilizado o material de referência certificado acetanilida, o qual verificou o controle de qualidade das determinações. Para determinar o percentual de carbono no melão foi utilizado um analisador de carbono orgânico total, (modelo TOC-V CPH/CPN, Shimadzu, Japão). A análise foi feita pelo método NPOC (non-purgeable organic carbon).

A concentração de nitrogênio da água de parboilização de arroz foi determinada através de Micro Kjeldahl, segundo metodologia descrita por AOAC, 2000.

2.3 Inóculo

O preparo do inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 90 mL do caldo YM, previamente esterilizado a 121°C por 15 min, e adicionado de 10 mL de cultivo, sendo incubado a 150 rpm, 25°C por 48 h ou tempo necessário para concentração celular atingir 10^8 células/mL, contadas em câmara de Neubauer (CHOI e PARK, 2003).

2.4 Bioprodução de carotenoides

Após a determinação da razão C/N no meio de cultivo YM foi estabelecida uma similar para os meios de produção apresentados na Tabela 2 contendo como substratos coprodutos industriais. Para realizar estas razões foi utilizada a ferramenta SOLVER disponível no programa EXCEL, onde a razão desejada era de 6,20 e as concentrações de carbono de 8,50 % e 1,37% de nitrogênio.

Tabela 2: Meios de bioprodução de carotenoides utilizando coprodutos agroindustriais.

Meio de cultivo	Componentes
A	Água de parboilização de arroz (39,91 g/L) + glicerol (17,31 g/L)
B	Água de parboilização de arroz (44,01 g/L)+ melaço (23,6 g/L)
YM	Meio YM (3 g/L extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose)

A bioprodução de carotenoides foi realizada através dos cultivos em frascos Erlenmeyers de 500 mL com 306 mL do meio de produção YM a pH inicial de 6,0, iniciando o cultivo com 1×10^7 células/mL, sendo as condições operacionais do processo 25°C, 180 rpm por 168 h (SILVA, 2009). Durante os cultivos amostras foram coletadas em 168 h para determinação da biomassa através de método gravimétrico, pH e a determinação da concentração de carotenoides totais.

2.5 Métodos Analíticos

2.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor de pH (Marte, Modelo MB-10, Brasil), segundo AOAC (2000).

2.5.2 Determinação da concentração de biomassa

A concentração celular ao longo da bioprodução do carotenóide foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, onde a conversão da absorbância em biomassa foi realizada utilizando uma curva padrão para cada microrganismo (KUSDIYANTINI, 1998) apresentadas no Apêndice (Figuras 1, 2 e 3).

2.5.3 Determinação da concentração de açúcares totais

A concentração de sacarose medida como açúcares totais foi determinada através do método DNS (MILLER, 1959), modificado por GARDA-BUFFON (2002).

2.5.4 Determinação da concentração de carotenoides totais

A determinação de carotenoides foi realizada com a célula seca a 35°C por 48 h e congelada a -18°C por 48 h, estas foram rompidas com adição de 2 mL de dimetilsufóxido por 1 h, agitando a 15 min em vórtex (Biomixer, Modelo QL-901, Brasil) para maior contato com o solvente, após foi adicionado 6 mL de acetona para a extração da carotenoides. As amostras foram agitada em vórtex para homogeneização do solvente e centrifugadas (Modelo 80-2B, Centribio) a 1870g por 10 min e a fase solvente separada, este procedimento foi repetido por duas vezes para a completa extração dos carotenoides. Fases solventes obtidas após a centrifugação foram misturadas e adicionados 10 mL de NaCl 20% e 10 mL de éter de petróleo, as amostras foram agitadas e após separação das fases, a fase superior contendo os carotenoides foi separada e filtrada em Na₂SO₄ anidro, sendo realizada a leitura espectrofotométrica (Biospectro, Modelo SP-22, China) a 474 nm. A concentração específica de carotenoides totais foi calculada usando o coeficiente de absorvidade de 2100, através da equação 1 (AN *et al.*, 1989).

$$C_t = \frac{A_{474} * V * 100}{21 * m} \quad (1)$$

Onde:

C_t = concentração específica de carotenoides totais (µg/g);

A_{474} : absorbância a 474 nm;

V : volume do filtrado (mL);

m : massa celular seca (g).

Para o cálculo da concentração dos carotenoides volumétricos totais (µg/L), foi realizada uma conversão de unidades utilizando o resultado da concentração de carotenoides específicos totais (µg/g) e a concentração da biomassa (g/L).

2.6 Análise estatística

Os cultivos foram feitos em triplicatas para cada micro-organismo selecionado sendo realizada análise de variância e teste de tukey ($p < 0,05$) para indicação das cepas de leveduras silvestres mais promissoras quanto à bioprodução de carotenoides em coprodutos industriais.

2.7 Cinética do cultivo microbiano e parâmetros estequiométricos

Com o objetivo de obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de consumo de substrato, produção de biomassa, evolução de pH e produção de carotenoides para os diferentes meios estudados foram conduzidas cultivos a 25°C, 180 rpm, durante 168 h, retirando-se amostras a cada 4 h nos dois primeiros dias e após este período no intervalo de 12 h.

2.7.1 Fatores de conversão

Os fatores de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$, substrato em biomassa $Y_{X/S}$ e a relação entre a produção de carotenoides e a produção de células $Y_{X/P}$ foram expressos pelas equações 2, 3 e 4, respectivamente (BORZANI *et.al*, 2001).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (2)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P_0 - P} \quad (3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

Onde:

X = biomassa

S = substrato

P = carotenoides

2.7.2 Produtividade e velocidade específica máxima de crescimento celular

A partir das curvas de crescimento celular e produção de carotenoides foram obtidos os seguintes parâmetros:

- $X_{m\acute{a}x}$ (g/L), correspondente à biomassa máxima atingida no respectivo tempo t, em h;
- Produtividade em células P_x (g/L.h), calculada conforme Equação 5;

$$P_x = \frac{X_{m\acute{a}x}}{t} \quad (\text{Eq. 5})$$

- $C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/g}$), correspondente a máxima concentração de carotenoides atingida no respectivo tempo t, em h;
- Produtividade em carotenoides P_c ($\mu\text{g/g.h}$), calculada conforme Equação 6;

$$P_c = \frac{C_{m\acute{a}x}}{t} \quad (\text{Eq. 6})$$

- Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$), definida pela Equação 7 e calculada através do *software* Microcal Origin 5.0.

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 7})$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

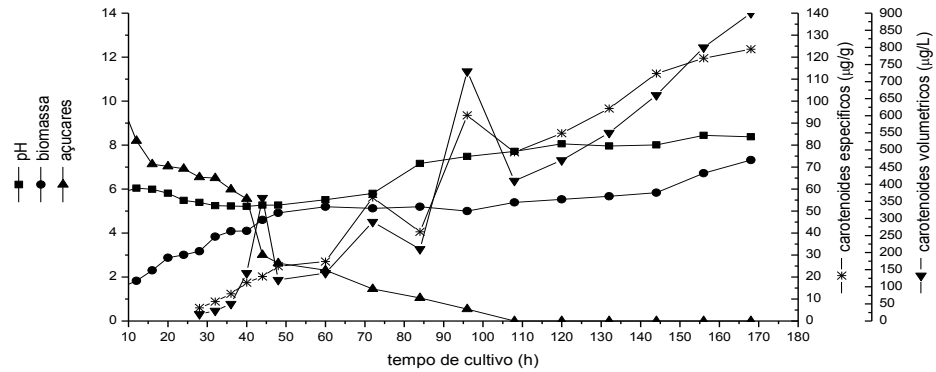
A caracterização parcial dos substratos dos meios de cultivo está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização parcial dos substratos presentes nos meios de cultivo.

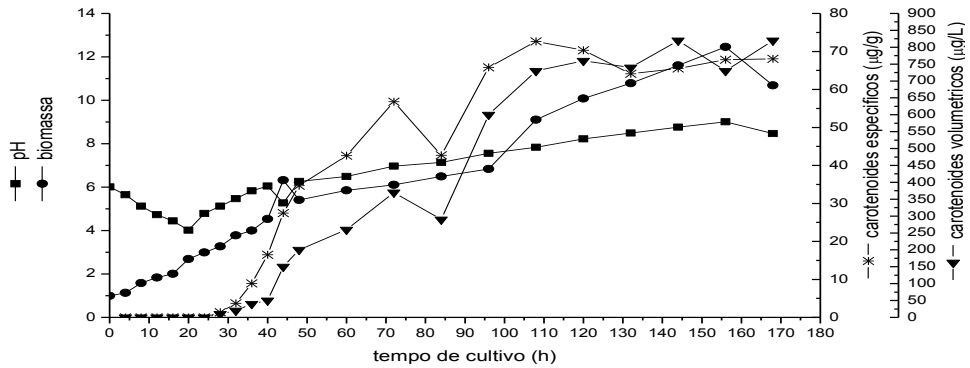
Amostra	% C	% H	% N
Extrato de levedura	38,40	5,65	10,67
Extrato de malte	39,24	6,54	10,93
Peptona	43,47	6,71	14,47
Água de parboilização de arroz	0,16	2,25	3,02
Melaço	36,50	-	0,30
Glicerol	49,30	-	1,05
Padrão			
Amostra 1	100,24	99,55	99,90
Amostra 2	100,29	102,83	99,81
% recuperação	100,63	106,90	100,87

A Figura 1 (a) apresenta a cinética de crescimento, evidenciando o consumo de substrato, evolução de pH e produção de carotenoides em YM para a levedura *Sporobolomyces pararoseus*. Enquanto que as Figuras 1 (b) e 1 (c) ilustram a cinética para o mesmo micro-organismo utilizando os meios de cultivo A (água de parboilização e glicerol) e B (água de parboilização e melaço).

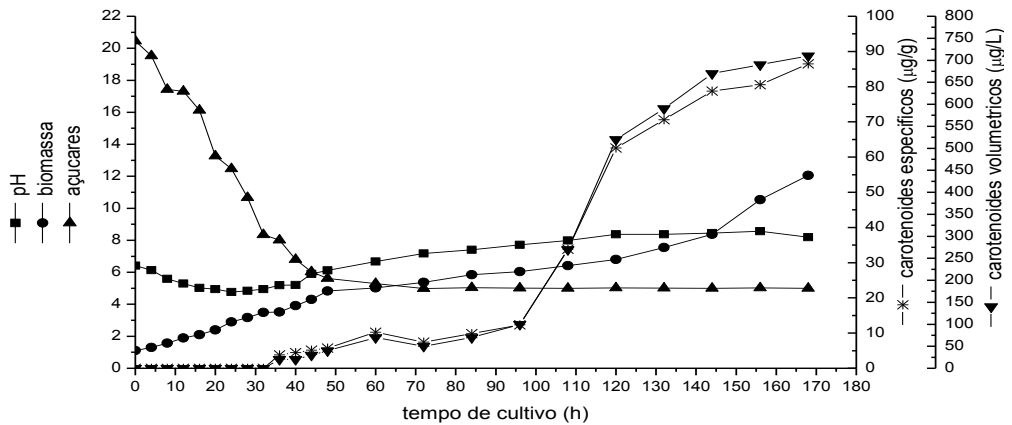
A levedura *Sporobolomyces pararoseus* apresentou comportamento diferente nos meios agroindustriais frente ao YM, uma vez que a produção de carotenoides neste meio alcançou 123,64 µg/g enquanto que para o meio A foi 86,46 µg/g porém, no meio contendo melaço foi 106,20 µg/g, o que se aproximou mais dos valores encontrados no YM. Isso pode ter ocorrido por que o melaço, segundo FELTRIN *et al.* (2000) e FONTANA *et al.* (2000), é um excelente meio de cultura para a produção de carotenoides por micro-organismos devido ao seu alto poder nutricional. Esses valores possivelmente podem ser maximizados através da otimização da composição do meio, tanto para o meio A quanto para o B utilizando pré-tratamentos nos coprodutos com a finalidade de retirar impurezas e metais pesados dos resíduos agroindustriais que possam interferir no cultivo.



(a)



(b)



(c)

Figura 1: Cinética de crescimento da *Sporobolomyces pararoseus*, consumo de açúcares, pH, produção de carotenoides e biomassa para meios YM (a), água de parboilização de arroz e glicerol (b) e água de parboilização de arroz e melaço (c).

A concentração da biomassa também apresentou diferenças, onde para o meio A foi de 12,06 g/L, para o meio B e de 10,69 g/L enquanto que no YM foi de 7,32 g/L todos em 168 h de cultivo. Potanto, os meios contendo coprodutos obtiveram valores superiores em biomassa.

A levedura apresentou comportamentos diferentes frente ao tempo necessário para iniciar a bioprodução dos carotenoides sendo que no YM a partir de 24 h já se observou produção (5,69 µg/g), no meio A foram necessárias 32 h (3,82 µg/g) e para o meio B 40 h (1,37 µg/g).

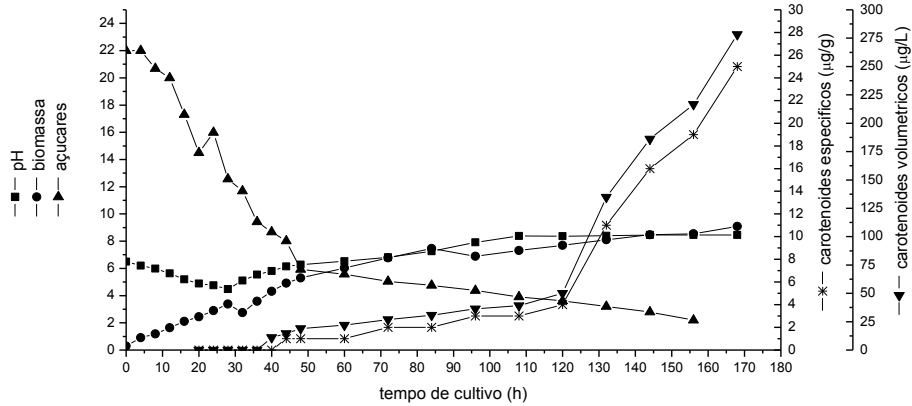
Os carotenoides volumétricos tiveram maior produção no meio YM (900 µg/L) seguido do meio A (820 µg/L) e meio B (710 µg/L).

No meio YM a levedura teve um decréscimo de pH até 72 h de cultivo, apresentando um comportamento igual ao descrito por FRENGOVA *et al.* (1994) o qual diz que a biossíntese de carotenoides ocasiona mudanças do pH do meio de cultivo, como consequência do crescimento das leveduras. De modo geral, o pH do meio decresce nas primeiras 72 h de cultivo, e seguido da elevação durante a fase intensa de carotenogênese. A partir daí o pH permanece mais constante, indicando o final do cultivo.

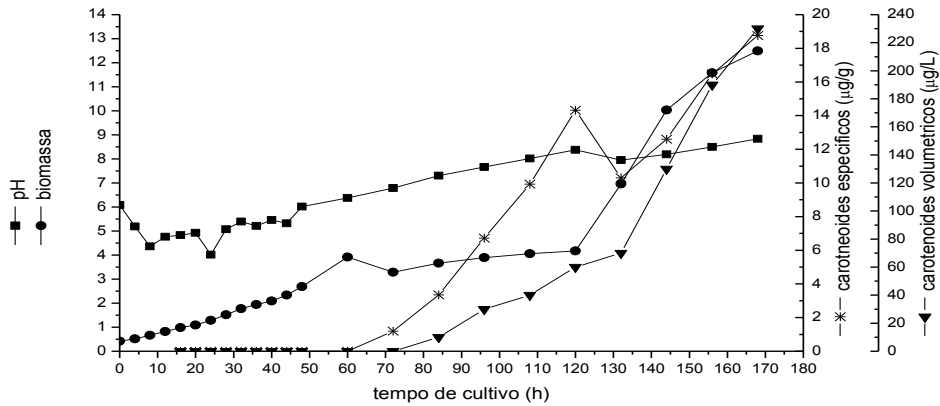
Os meios A e B apresentaram comportamento distinto ao esperado (apresentar queda) frente ao pH, pois em 24 h de cultivo o pH do meio começou a elevar-se atingindo valores finais de 8,47 e 8,19 respectivamente. Esse comportamento pode estar associado à composição dos meios, uma vez que possuem uma complexidade maior, contendo nutrientes (nitrogênio, potássio, magnésio, manganês, ferro, etc), metais pesado, sais e etc., conforme citado por VALDUGA *et al.* 2008.

Observando as Figuras 1 (a), (b) e (c) verifica-se que o meio YM permitiu a obtenção de maiores produções. Desta forma, percebe-se que, a menor produção pode ser devido a metabolização de compostos nitrogenados, liberando grandes quantidades de amônia ao meio, quando se utilizam substratos agroindustriais. Esta hipótese concorda com os resultados observados para o pH, onde se observa que há um grande aumentos destes nos meios agroindustriais ao contrário do cultivo utilizando meio YM.

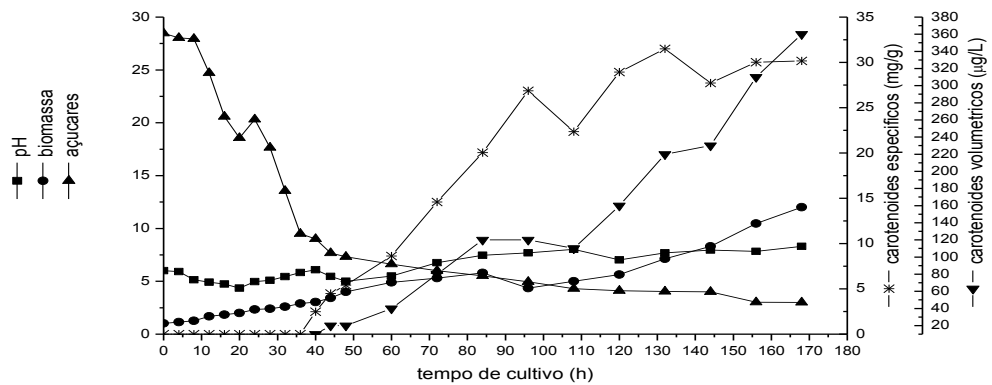
A Figura 2 (a) ilustra o comportamento cinético da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em meio Extrato de Malte e Levedura (YM), e as Figuras 2 (b) e (c) em meio agroindustrial A (água de parboilização + glicerol) e B (água de parboilização + melaço) respectivamente.



(a)



(b)



(c)

O cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* resultou em concentração final de carotenoides de 30,16 µg/g utilizando o meio agroindustrial B, mais elevada em relação ao YM (28,06 µg/g) e ao meio A (18,76 µg/g). Isso pode ter ocorrido por que o melaço é um excelente meio de cultura para a produção de carotenoides por micro-organismos devido ao seu alto poder nutricional devido ao seu alto teor de carboidratos, possivelmente a produção de carotenóides está relacionada à composição deste substrato e/ou à bioprodução de compostos secundários, pois o melaço de cana-de-açúcar possui uma composição bastante complexa, contendo nutrientes (nitrogênio, potássio, magnésio, manganês, ferro, etc), que individualmente podem influenciar positivamente na bioprodução de carotenóides como é o caso da presença de mevalonato no melaço, um precursor natural de carotenóides (FONTANA *et al*, 2000 ; VALDUGA, *et al*, 2008).

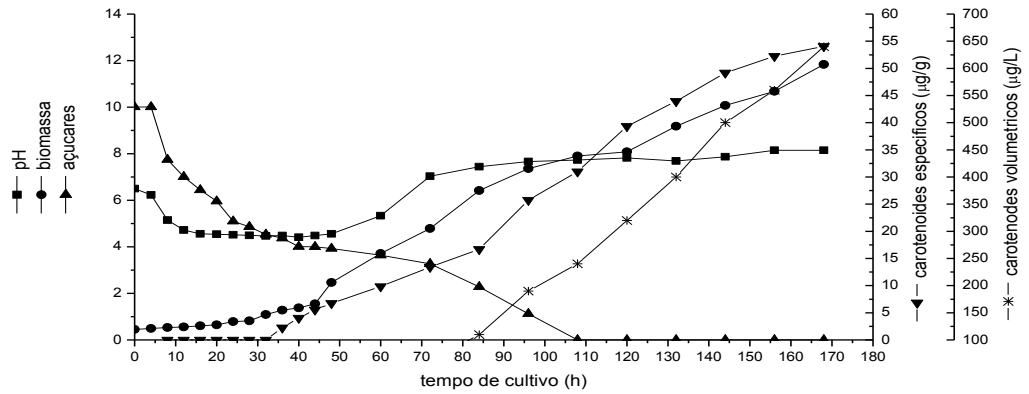
Quanto à produção de biomassa os maiores valores (12,49 g/L) foram para o meio agroindustrial A seguido do meio B (12,02 g/L) e por ultimo o YM (11,18 g/L). Estes valores não apresentaram grandes diferenças tão grandes entre si, menores que 1,5 g/L.

Durante a produção de carotenoides a levedura se comportou de forma semelhante no meio YM e no meio agroindustrial A, onde começou a produção em 72 h de cultivo, enquanto no meio contendo melaço o qual apresentou a maior produção, em 40 h já foi possível observar a presença do bioproduto. O substrato disponível para o cultivo não foi totalmente consumido nos meios YM e B, onde no YM os açúcares disponíveis eram 10,60 g/L e ao término do cultivo foi de 2,24 g/L e para o meio B a concentração inicial era de 28,47 g/L e a final de 3 g/L.

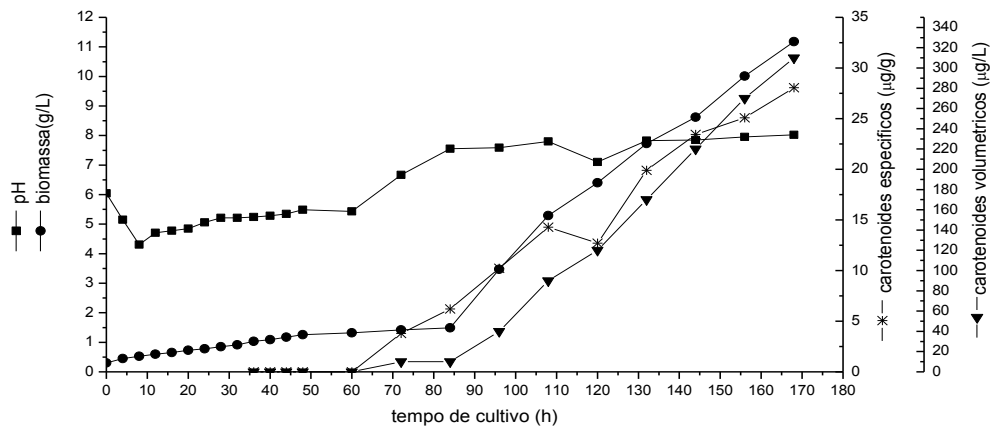
O pH teve o comportamento esperado para as leveduras o qual apresenta um decréscimo nas primeiras horas e um posterior aumento. O pH do meio de cultivo no meio YM, apresentou um pH final (168 h) menor quando comparado aos meios utilizando substratos agroindustriais (melaço, água de parboilização de arroz e glicerol) para a bioprodução de carotenoides.

Os carotenoides volumétricos no YM foram observados a partir de 44 h de cultivo atingindo 250 µg/L em 168h, em meio contendo APA e melaço teve produção máxima de 230 µg/L enquanto que no meio B e seu máximo foi de 360 µg/L em 168h superando os valores alcançados no meio YM.

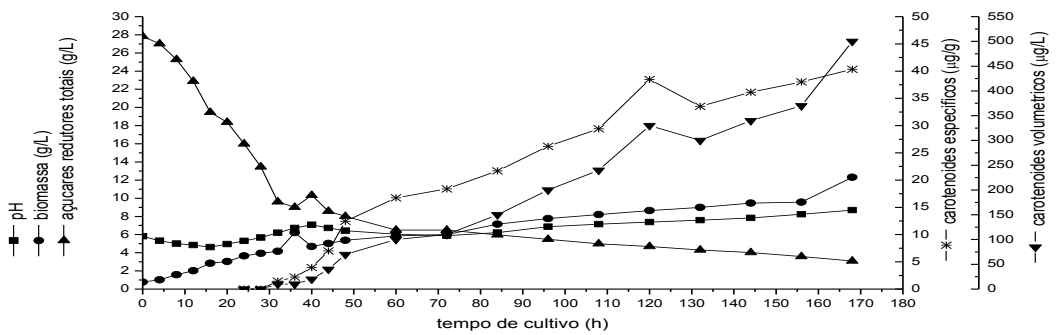
A Figura 3 (a) ilustra o comportamento cinético da levedura *Pichia fermentans* em meio Extrato de Malte e Levedura (YM), e as Figuras 3 (b) e 3 (c) em meio agroindustrial A (água de parboilização + glicerol) e B (água de parboilização + melaço).



(a)



(b)



(c)

Através das Figuras 3 (a), (b) e (c) pode-se observar que o pH sofre decréscimos nas primeiras horas, para o YM o pH começa a se elevar em 60 h, para o meio A em 24 h e para o meio B em 28 h. Os valores de pH iniciais são de pH são de 6,04 para o meio YM, 6,50 para o meio contendo glicerol (A) e para o meio contendo melaço (5,82). O pH ao término do cultivo apresentou o maior valor (8,96) para o meio B seguido do meio A (8,45) e do YM (8,15). O melaço é um subproduto da indústria de açúcar que é utilizado com grande frequência como fonte de carbono na indústria de cultivos. Porém, altas concentrações de metais pesados no meio causam problemas críticos durante a cultivo, como alterações no pH do substrato (VALDUGA, 2007).

A bioprodução foi mais elevada no meio YM onde os valores de carotenoides específicos foram de 54,07 µg/g. Da mesma forma como ocorreu com as demais leveduras no meio contendo melaço (B) a bioprodução foi mais elevada (40,33 µg/g) quando comparada ao meio A (27,83 µg/g) no qual esse tipo de comportamento já foi discutido anteriormente. A detecção de carotenoides no meio YM foi observada em 36 h, enquanto que para os meios contendo coprodutos (A e B) o tempo foi de 40 e 32 h, respectivamente.

As concentrações celulares alcançaram após o término do cultivo, 12,32 g/L para o meio B, seguido do meio YM onde *Pichia fermentans* produziu 11,84 g/L e do meio A com uma produção de 9,09 g/L.

O consumo de açúcar no meio YM foi total onde inicialmente havia uma concentração de 10,01g/L onde em 96 h caiu para 1,12 g/L. Diferentemente dos meios agroindustriais, onde a concentração de açúcares era maior (27,83 g/L para o meio B), tendo valores finais 3,09 g/L.

No meio YM a produção máxima de carotenoides volumétricos foi 640 µg/L, no meio A de 310 µg/L enquanto que no meio B o máximo da produção foi de 500 µg/L.

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os parâmetros cinéticos para as leveduras *Sporobolomyces pararoseus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia fermentans* calculados para o cultivo nos três meios (YM, A e B).

Tabela 3: Parâmetros cinéticos do cultivo em meio YM e agroindustrial para a levedura *Sporobolomyces pararoseus*.

Parâmetros	YM	Meio A	Meio B
P_x (g/L.h)	0,040	0,065	0,068
P_c (μ g/g.h)	0,700	0,491	0,624
$Y_{P/S}$	10,300	5,588	-
$Y_{X/S}$	0,526	0,700	-
$Y_{P/X}$	19,563	7,895	10,94
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,28	0,15	0,28

Tabela 4: Parâmetros cinéticos do cultivo em meio YM e agroindustrial para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

Parâmetros	YM	Meio A	Meio B
P_x (g/L.h)	0,064	0,071	0,065
P_c (μ g/g.h)	0,144	0,104	0,164
$Y_{P/S}$	3,362	0,940	-
$Y_{X/S}$	1,290	0,600	-
$Y_{P/X}$	2,605	1,554	2,741
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,16	0,14	0,24

Tabela 5: Parâmetros cinéticos do cultivo em meio YM e agroindustrial para a levedura *Pichia fermentans*.

Parâmetros	YM	Meio A	Meio B
P_x (g/L.h)	0,067	0,052	0,068
P_c (μ g/g.h)	0,309	0,159	0,231
$Y_{P/S}$	5,401	1,354	-
$Y_{X/S}$	1,130	0,428	-
$Y_{P/X}$	4,747	3,162	3,496
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,17	0,28	0,20

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os principais parâmetros cinéticos para as leveduras *Sporobolomyces pararoseus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia fermentans*

respectivamente, calculados para os cultivos conduzidos em meio YM e em meios agroindustriais A e B. Nestas condições, observou-se que a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi encontrada para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* com valores iguais a $0,28 \text{ h}^{-1}$ para os meios YM e para o meio B (contendo água de parboilização de arroz e melaço), mesmo valor encontrado para a levedura *Pichia fermentans* quando foi utilizado o meio contendo água de parboilização de arroz e glicerol, a levedura *Sporobolomyces pararoseus* teve uma velocidade de crescimento (μ_{max}) de $0,24 \text{ h}^{-1}$ para o meio contendo melaço (B) e os menores valores ($0,14 \text{ h}^{-1}$) para o meio A.

A produtividade em células (P_x) máxima é de $0,071 \text{ g/L.h}^{-1}$ para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em meio agroindustrial A. O menor valor de P_x ($0,040 \text{ g/L.h}^{-1}$) foi encontrado para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* em meio convencional.

Conforme os resultados das tabelas 3,4 e 5, observa-se que o fator de conversão $Y_{x/S}$ é igual a 1,29 e 1,13 g/g no meio convencional para as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia fermentans*, respectivamente. Este é um valor muito alto e sugere que há consumo de outro substrato, possivelmente as fontes de nitrogênio utilizadas, como o extrato de malte e peptona. Para o meio agroindustrial obtem-se um valores menores para este parâmetro, que variam de 0,40 a 0,70 g/g.

Para as três leveduras observa-se que para o fator de conversão $Y_{P/S}$, para o meio convencional é mais elevado do que para os meios agroindustriais. Sendo que para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* esse fator é de $10,300 \mu\text{g/g}$.

A levedura *Pichia fermentans* obteve os valores mais elevados para a maioria dos parâmetros no meio YM, onde P_x e $\mu_{\text{máx}}$ não tiveram seu máximos em YM e sim no meio B e A respectivamente. *Rhodotorula* apresentou melhores resultados para P_c , $Y_{P/X}$ e $\mu_{\text{máx}}$ no meio contendo água de parboilização e glicerol, seguido do YM que teve melhores $Y_{P/S}$ e $Y_{x/S}$. A levedura *Sporobolomyces pararoseus* apresentou os maiores valores de P_c , $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ no meio YM, o $\mu_{\text{máx}}$ apresentou os mesmos resultados para o meio YM e para o meio B e o meio A foi superior aos demais somente para $Y_{x/S}$.

Os meios para produção de carotenoides utilizando co produtos industriais são uma alternativa muito interessante frente a produção do pigmento bem como ao custo da produção, uma vez que a bioprodução em um litro de YM custa R\$ 9,83 e os co produtos custam: R\$ 1,72 o litro de glicerol, R\$ 3,00 o litro do melaço e a água de parboilização de arroz, por ser um rejeito das beneficiadoras de arroz, não apresenta valor de mercado.

4.CONCLUSÕES

A concentração máxima de carotenoides totais para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* em meio YM é de 123,64 µg/g e nos agroindustriais A e B de 86,46 e 106,20 µg/g respectivamente. Para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* os valores são de 28,06 µg/g no YM e 18,76 µg/g (meio A) e 30,16 µg/g (meio B). Para a *Pichia fermentans* a concentração máxima de carotenoides totais (54,07 µg/g) foi observada no cultivo contendo o meio YM seguida do meio B com valores de 40,33 µg/g e 27,83 µg/g para o meio A.

O pH do meio de cultivo, em substratos como a glicose, extrato de malte, extrato de levedura e peptona, apresentou uma pequena variação no decorrer do processo fermentativo (168 h) quando comparado aos meios agroindustriais, variando entre 6 e 9. No entanto observou-se que ao utilizar substratos agroindustriais (melaço, água de parboilização e glicerol) para a bioprodução de carotenoides ocorreu um pequeno aumento no pH final.

O $\mu_{\text{máx}}$ para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* variou de 0,15 a 0,29 h⁻¹ para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* 0,14 a 0,24 h⁻¹ e para a *Pichia fermentans* esses valores ficaram entre 0,17 a 0,28 h⁻¹.

O meio YM permitiu a obtenção das maiores produtividades do produto de interesse (carotenoides) tanto para *Sporobolomyces pararoseus* quanto para *Pichia fermentans* porém o mesmo não ocorreu para *Rhodotorula mucilaginosa* que alcançou valores mais elevados dos bioprodutos em meio contendo água de parboilização e melaço.

Assim sendo os coprodutos agroindustriais apresentaram resultados satisfatórios frente a produção de carotenoides, uma vez que estes foram utilizados na sua forma bruta, sem sofrer pré tratamentos, caso este ocorra possivelmente altere de forma positiva a bioprodução dos carotenoides.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, G. H.; SCHUMAN, D.B.; JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astxanthin content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 116-124, 1989.

AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 2000.

BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 4 vol. 2001.

BRINGHENTI,L.;CABELLO,C.; URBANO,L.H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Ciência Agrotecnologica.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.

COELHO, A.R. **Controle de penicillium expansum / biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita**. Tese. Universidade Federal do Paraná, Brasil. 2005.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste. **Chinese Cabbage Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.

FELTRIN, V P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, A. C. S.;TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. [online]. vol.43, n.1, pp. 0-0. 2000.

FONTANA, J.D. Carotenoides. **Biotecnologia , Ciência e Desenvolvimento**. n.13. p.40-45.2000.

FRENGOVA,G.;SIMOVA,E.;PAVLOVA,K.;GRIGROVA,D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**.v.44, p.888-894. 1994

GARDA-BUFFON, J. **Micotoxinas em cerveja: metodologia, ocorrência e influência nos processos fermentativos**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

KIM J. H., KANG S.W, KIM S.W., CHANG H.I., High-level production of astaxantin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical experimental designs. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.69, p.1743-1748, 2005.

KUSDIYANTINI, E. *et al.*, Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 929-934, 1998.

MILLER, G/L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, p. 426-428.1959

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R.V.; MARTINS, M. L. L.; Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* Termofílico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(2): 417-421, abr.-jun. 2007

NASCIMENTO,R.M. **Variação sazonal de carotenoides provitamina A (α - ϵ - β -caroteno) e vitamina E (α - ϵ - δ - tocoferol) em 2 espécies de macro algas marinhas pertencente ao gênero *Cryptomenia***. Dissertação. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2009.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) utilizando água de parboilização do arroz**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2009.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenoides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas: , v.22, n.3, p.254 - 258, 2002.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. Tese. Florianópolis, Brasil, 2005.

VALDUGA, E. *et al.*. Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, p. 1860-1866, 2007.

VALDUGA, E. *et al.* Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1267-1274, 2008.

TATSCH, P.O. **Produção de Carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 e biorreator**. Dissertação. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2008.

UENOJO, M.; JUNIOR, M.R.M; PASTORE, G.M. Carotenoids: properties, applications and biotransformation in flavor compounds. **Química Nova**, v. 30 n. 3, p. 616-621, 2007.

CAPITULO V

CONCLUSÕES GERAIS

4. CONCLUSÕES GERAIS

Dentre as 147 amostras ambientais coletadas isolou-se 65 leveduras, as quais foram testadas frente a bioprodução de carotenóides e para cada coloração (amarelo, laranja e rósea) foi selecionada um levedura de destaque.

A levedura que mais se destaca frente a produção dos carotenoides é a *Sporobolomyces pararoseus* que apresentou valores máximos de carotenóides de 123,64 µg/g e 0,905 µg/mL, produção de biomassa de 7,32 g/L. A concentração máxima de carotenoides totais para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* em meio contendo glicerol e água de parboilização de arroz foi de 86,46 µg/g e de 106,20 µg/g para o meio contendo melaço e água de parboilização de arroz respectivamente. Os carotenoides produzidos por esta levedura foram identificados como luteína, β-criptoxantina e β-caroteno.

Os valores máximos de corantes (luteína, β-criptoxantina e β-caroteno) produzidos pela *Pichia fermentans* foram de 54,07 µg/g e 0,640 µg/mL, a concentração celular de 11,84 g/L, a qual foi atingida ao término do cultivo. Para os meios contendo coprodutos a concentração máxima de carotenoides foi observada no cultivo contendo melaço com valores de 40,33 µg/g e 27,83 µg/g para o meio com glicerol.

O comportamento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* frente a produção dos carotenoides foi a mais baixa, com valores máximos de 28,06 µg/g e 0,310 µg/mL, sendo a concentração celular de 11,18 g/L após 168 h de cultivo. Esta levedura produziu carotenoides de coloração laranja, os quais foram caracterizados como sendo luteína. Para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* os valores são de 18,76 µg/g (meio A) e 30,16 µg/g (meio B).

A bioprodução de carotenoides apresentou associação com o crescimento celular, sendo que a relação entre a produção de carotenoides e o crescimento celular (P_x) foi de 19,56 µg/g para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* no meio YM, bem diferente ao encontrado para os meios agroindustriais A (7,89 µg/g) e 10,94 µg/g para o meio B, destacando-se das demais leveduras.

O pH do meio de cultivo, em substratos como a glicose, extrato de malte, extrato de levedura e peptona, apresentou uma pequena variação no decorrer do processo de cultivo (168 h) quando comparado aos meios agroindustriais, variando entre 6 e 9. No entanto observou-se que ao utilizar substratos agroindustriais (melaço, água de

parboilização e glicerol) para a bioprodução de carotenoides ocorreu um pequeno aumento no pH final.

O $\mu_{\text{máx}}$ para a levedura *Sporobolomyces pararoseus* variou de 0,15 a 0,29 h⁻¹ para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* 0,14 a 0,24 h⁻¹ e para a *Pichia fermentans* esses valores ficaram entre 0,17 a 0,28 h⁻¹.

O meio YM permitiu a obtenção das maiores produtividades do produto de interesse (carotenoides) tanto para *Sporobolomyces pararoseus* quanto para *Pichia fermentans* porém o mesmo não ocorreu para *Rhodotorula mucilaginosa* que alcançou valores mais elevados dos bioprodutos em meio contendo água de parboilização e melaço.

Os resultados deste trabalhos foram satisfatórios, uma vez que foram isoladas três leveduras ambientais capazes de produzir carotenoides e de crescer em meios contendo coprodutos agroindustriais, sem maiores perdas no produto final de interesse.

5. Sugestões para futuros trabalhos

- Testar diferentes pré tratamentos nos coprodutos agroindustriais utilizados neste trabalho;
- Otimizar os meios de cultivo para cada levedura isolada (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces pararoseus* e *Pichia fermentans*);
- Realizar isolamento nos demais Ecossistemas do Rio Grande do Sul (Nascente do rio Forqueta, Turvo, Quarta Campanha, Litoral Norte, etc.) com a finalidade de encontrar leveduras com interesse biotecnológico.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast of *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p.2985 – 2991, 2005.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35 p. 107-113, 2007.

ALVES, R. W. **Extração de corantes de urucum por processos adsorptivos utilizando argilas comerciais e Colloidal gas aphasors**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

AMATO, G. W.; CARVALHO, J.L.V.; SILVEIRA, S.. **Arroz parboilizado: tecnologia limpa, produto nobre**. 1 ed. Porto Alegre: Ricardo Lenz, 2002.

AMBRÓSIO, C.L.B.; CAMPOS, F.A.C.S.; FARO, Z.P. Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. **Revista Nutrição**. Campinas, v.19, p.233-243, 2006.

AN, G. H.; SCHUMAN, D.B.; JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astxanthin content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 116-124, 1989.

ANDRADE, S.V. **Otimização da produção de carotenoides a partir de fungos filamentosos (mucorales)**. Tese. Universidade Federal do Recife, Brasil, 2003.

ARAÚJO, K.M; OLIVEIRA, A.K.C; COSTA, G.B; QUEIROGA, R. N. G. e PANNIR SELVAM, P.V. Estudo comparativo técnico e econômico de diferentes óleos vegetais brasileiros para produção de biocombustível, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. **4º Encontro de energia do meio rural-AGRENNER**, v.1, 2002

ARRUDA P. V., RODRIGUES R. C. L. B. FELIPE M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP. **Revista Analytica**, nº 26, 2007.

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

Association of Official Analytical Chemists – AOAC.; **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 2000.

AUGUSTI, P. R. **Efeito dos carotenoides licopeno e astaxantina sobre danos renais induzidos por cloreto de mercúrio**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p.351-361, 2004.

BIODIVERSIDADE. Disponível em: <http://www.agua.bio.br> . Acesso em: 6 de maio de 2010.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. Tese (PhD Thesis) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 4 vol. 2001.

BOTELLA-PAIVA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoids biotechnology in plants form nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v.12, p.369-381, 2006.

BRAGA, A.R.C.; GOMES, P.A.; KALIL, J.S. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -Galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Food Bioprocess Technol.* 2011

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA SECRETARIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Normas de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do arroz.** Brasília, v.8, n.20, p.1-25, 1988.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L.H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melão de cana. **Ciência Agrotecnológica.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.

BRISSON, D; VOHL, MC; ST-PIERRE, J; HUDSON, TJ; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process? In: **Bio Essays** v.23, p. 534-542, 2001.

COELHO, A.R. **Controle de penicillium expansum / biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita.** Tese. Universidade Federal do Paraná, Brasil. 2005

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste. *Chinese Cabbage Biomass and Bioenergy*, v. 25, p. 221-226, 2003.

CHUMPOLKULWONG, N.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S.; NISHIO, N. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v.83, n.5, p.429-434, 1997.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J.; Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v.281 p.225–231, 2005.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.66, p.249-252, 2004.

DUFOSSÉ, C.L.; FERON,G.; MAUVAIS,G.; BONNARME, P.; ANDSPINLER, H.E. Production of r-decalactone and 4- hydroxyl-decanoic acid in microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. **Trends in Food Science & Technology**, v.16,p.398- 406, 2005.

EMERENCIANO, M. G. C.; WASIELESKY, W.; SOARES, R. B.; BALLESTER, E. C.; IZEPPI, E. M.; CAVALLI, R. O. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase berçário em meio heterotrófico. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n.1, p. 1-7, 2007.

FARIA, O. L. V.; KOETZ, P. R.; SANTOS, M. S.; NUNES, W. A. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada seqüencial (RBS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.26, v.2, p.309-317, 2006.

FELTRIN, V P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, A. C. S.;TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melão de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. [online]. vol.43, n.1, pp. 0-0. 2000.

FONTANA, J.D. Carotenoides. **Biotecnologia , Ciência e Desenvolvimento**. n.13. p.40-45.2000.

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

FRENGOVA,G.;SIMOVA,E.;PAVLOVA,K.;GRIGROVA,D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**.v.44, p.888-894. 1994

GALE, CR; ASHURST, HE; POWERS, HJ; MARTYN, CN. Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. **American Journal Clinical Nutrition**., v.74, p.402-408, 2001.

GARDA-BUFFON, J. **Micotoxinas em cerveja: metodologia, ocorrência e influência nos processos fermentativos**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, SP, 2008.

GOMES, F. S. Carotenoides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista Nutrição e Câncer**. v.20, n.5, p. 537-548, 2007.

HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. S. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 133-142, 2003.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileira**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.

HIANE, P. A.; BOGO, D.; RAMOS, M.I.L.; RAMOS-FILHO, M.M. Carotenoides pró-vitamínicos A e composição em ácidos graxos do fruto e da farinha de bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 206-209, 2003.

IVO, M. I. **Leveduras do abacaxi**. Dissertação, Escola Paulista de Medicina, São Paulo. 1982.

KIM J. H., KANG S.W, KIM S.W., CHANG H.I., High-level production of astaxantin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical experimental designs. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.69, p.1743-1748, 2005.

KUSDIYANTINI, E. *et al.*, Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 929-934, 1998.

LADEIRA,S.A.; ANDRADE,M.V.V; DELATORRE,A.B.;PEREZ, V.H.; MARTINS,M.L.L. Protease production using agroindustrial residues by thermophilic *Bacillus* sp in submerged fermentation: optimization of the culture medium using an experimental design approach. **Quím. Nova.** vol.33 n.2. p.324-328. 2010.

LANCETTE, G. A. TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTTOESSER, D. F. (Ed). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, p. 533-550, 1992.

LIBKIND,D.; BROOCK. Mucosporines in carotenogenic yeast. **Sistematic and Apllied Microbiology**,v.28, p.749-754, 2006.

LIU, Y.S.; WU, J.Y. Optization of cell growth and carotenoid production of Xanthophyllomyces dendrorhous through ststistical experiment desing. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.182-189, 2007.

LINS, R.T. **Determinação de tocoferóis e carotenoides em frutas amazônicas: Implantação de uma metodologia**. Dissertação. Universidade Belém, Brasil, 2006.

MALDONADE, I.R. **Produção de carotenoides por leveduras**. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, R. P. Carotenoids of yeast isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v.170, p.145-150. 2008

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

MANERA, A. P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; RODRIGUES,M.I.;KALIL, S.J.; MAUGERI, F.F. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de

β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology** Maringá, v. 33, n. 2, p. 155-161, 2011.

MAKINO, Y.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Inulinase bio-production using agroindustrial residues: screening of microorganisms and process parameters optimization. **J Chem Technol Biotechnol** p. 1056–1062. 2009.

MELENDÉZ-MARTINEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREIDA, F.J. Importância nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, vol.54, n.2, p.149-155. 2004.

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

MORAIS, F. L. **Carotenoides: características fisiológicas e químicas. Especialização em Qualidade de Alimentos**. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MÜLLER, M.C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; LOURENÇO, S.O. Carotenoids of the cyanobacterium *Synechocystis pevalekii* produced under normal conditions and under nutrient limitation. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**. v.39, n.4, p.415-423, 2003.

NAJAFPOUR, G. D.; SHAN, C. P. Enzymatic hydrolysis of molasses. **Bioresource Technology**, v.86, p. 91-94, 2003.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R.V.; MARTINS, M. L. L.; Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* Termofílico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(2): 417-421, abr.-jun. 2007

NASCIMENTO, R.M. **Variação sazonal de carotenoides provitamina A (α - ϵ - β -caroteno) e vitamina E (α - ϵ - δ - tocoferol) em 2 espécies de macro algas marinhas**

pertencente ao gênero *Cryptomenia*. Dissertação. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2009.

NISHIN, O. H.; MURAKOSHI, M.; LI, T.; TAKEMURA, M.; KUCHIDE, M.; KANAZAWA, M. Carotenoids in cancer chemoprevention. **Cancer Metastasis Reviews.**, v.21, p. 257-64, 2002.

OLIVEIRA, R. B. de. **Taxonomia de leveduras associadas com cajus e mangas**. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1980.

OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Archivment Latino American Nutrition.** v.49, p.7-11, 1999.

OMONI, A.O; ALUKO, R.O. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends Food Science Technology**; v.16, p.344-350, 2005.

PINOTTI, T. **Diversidade de leveduras endofíticas em plantas de agricultura orgânica (Seropedica - RJ) e sua produção de micocinas e proteases**. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2010

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. 1ª edição; São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 155p., 2004.

RIVALDI, et al. Glicerol de biodisel-Estratégias biotecnológicas para o desenvolvimento do glicerol gerado da produção de biodisel. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** v.37, p 44-51, 2007.

ROBBS, P.G. **Ecologia e taxonomia de leveduras em uma plantação de abacaxi do estado do Rio de Janeiro**. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1986.

SAMOCHA, T. M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; ALI, A. M.; BURGER, J. M.; ALMEIDA, R.V.; AYUB, Z.; HARISANTO, M.; HOROWITZ, A.; BROCK, D. L. Use of molasses as

carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquacultural Engineering**, v.36, p. 184-191, 2007.

SELLA, S. R. B. R.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S; MEDEIROS, A. B. P; SOCCOL, C.R. Lab-Scale production of *Bacillus atrophaeus*' spores by solid state fermentation in different types of bioreactors. **Braz. Arch. Biol. Technol.** vol.52.p.159-170. 2009.

SENTANIN, M.A.; RODRIGUEZ - AMAYA, D.B. Carotenoid levels in papaya and peach determined by high performance liquid chromatography. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.1, p. 13-19, 2007.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenoides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas: , v.22, n.3, p.254 - 258, 2002.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2009.

TATSCH, P.O. **Produção de Carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 e biorreator**. Dissertação. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2008.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. Tese. Florianópolis, Brasil, 2005.

VALDUGA, E. *et al.*. Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, p. 1860-1866, 2007.

VALDUGA, E. *et al.* Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1267-1274, 2008.

UENOJO, M.; JUNIOR, M.R.M; PASTORE, G.M. Carotenoids: properties, applications and biotransformation in flavor compounds. **Química Nova**, v. 30 n. 3, p. 616-621, 2007.

YARROW, D. **Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts**. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed). *The Yeasts: a taxonomic study*. 4 ed. Amsterdam: Elsevier Publs. B.V., p.77-100, 1998.

ZAMBIAZI, R. **The role of endogenous lipid components on vegetable oil stability**. Manitoba/Canadá, 1997. 304 f. Thesis (Doctor of Philosophy), Food and Nutritional Sciences Interdepartmental Program, University of Manitoba.

ZENI, J. **Screening de micro-organismos produtores de carotenoides e poligalacturonases**. Dissertação. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus de Erechim, Erechim - Rio Grande do Sul, 2008.

APÉNDICE

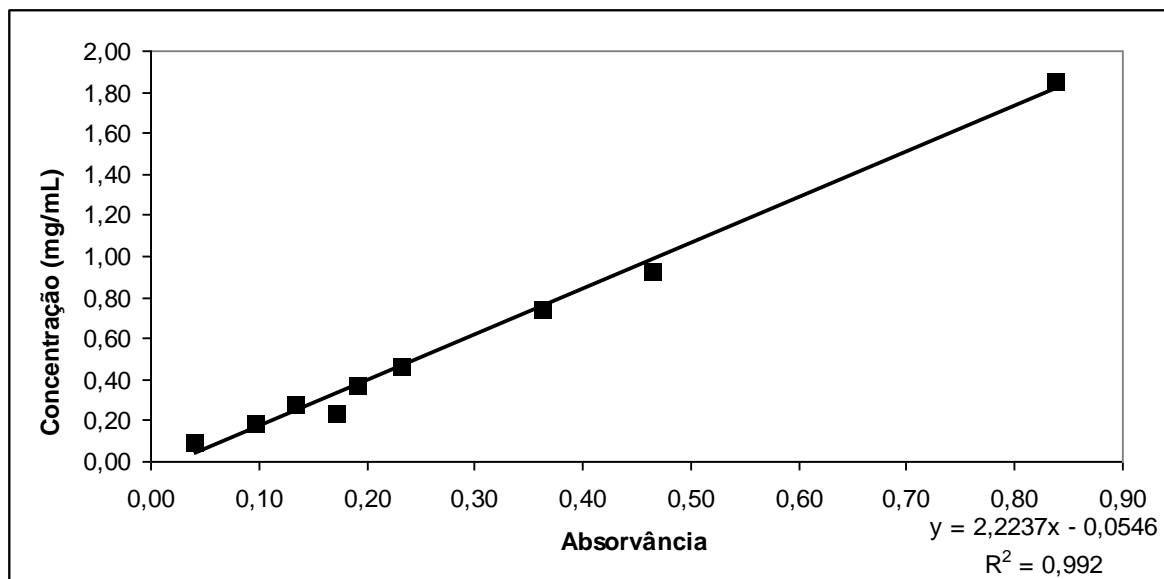


Figura 1: Curva padrão de biomassa para *Sporobolomyces pararoseus*

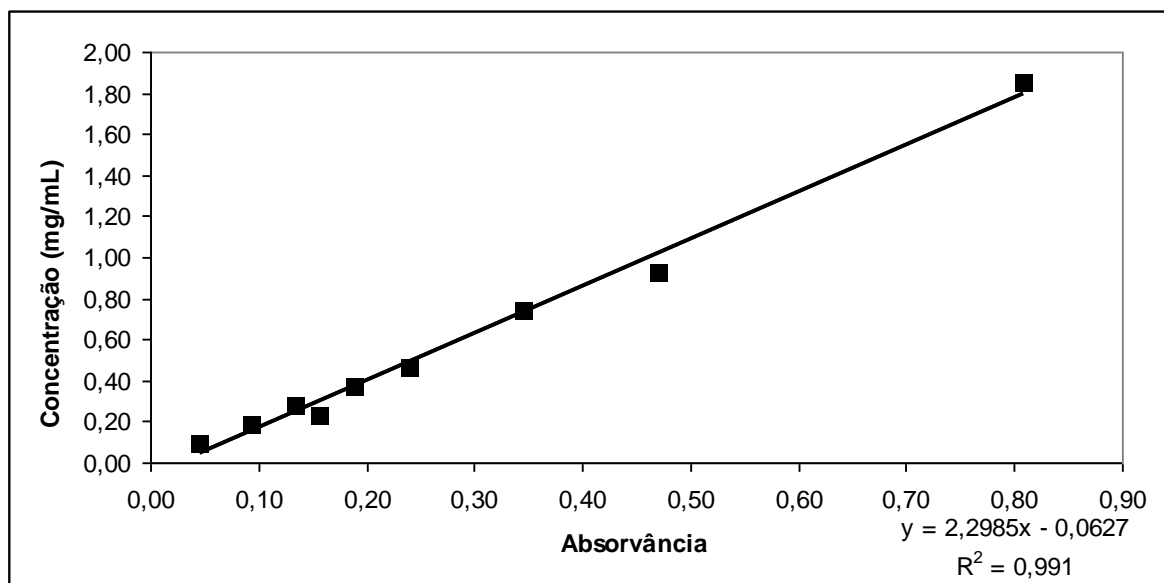


Figura 2: Curva padrão de biomassa para *Rhodotorula mucilaginosa*

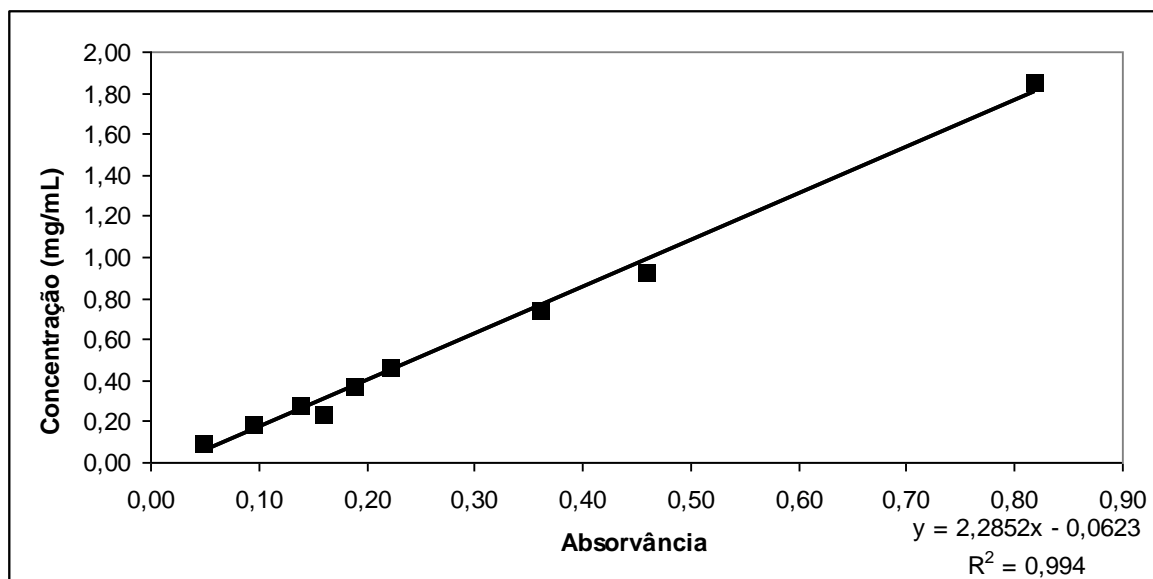


Figura 3: Curva padrão de biomassa para *Pichia fermentans*

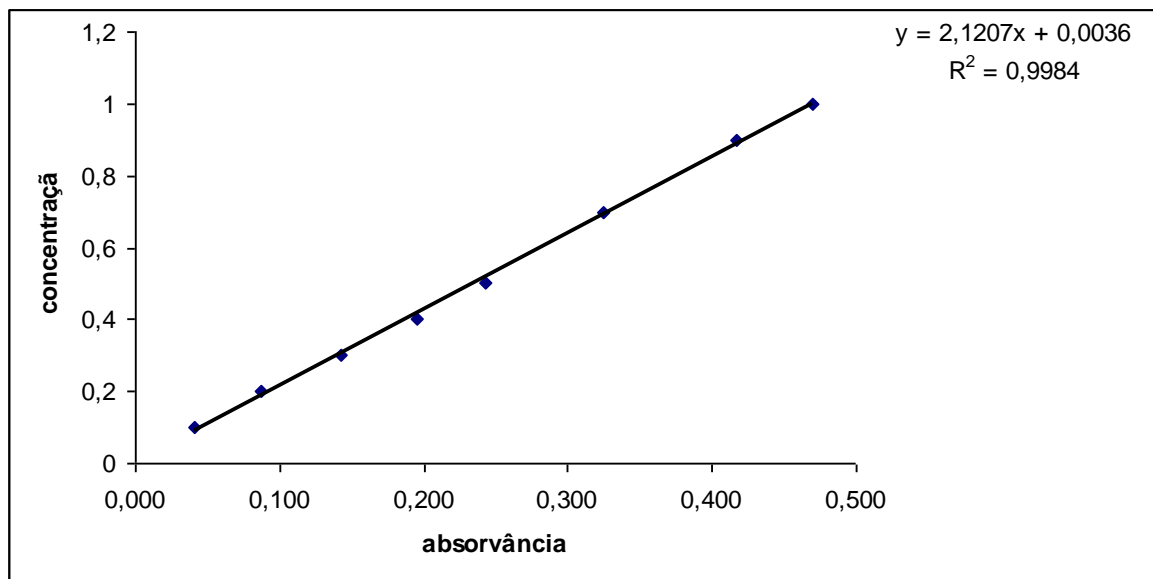


Figura 4 : Curva padrão de açúcares

Tabela 1: Período de realização das coletas, bem como as cidades e os Ecossistemas envolvidos.

Período	Cidades	Localidade	Ecossistema
20/09/09	Caçapava do Sul	Pedra do Segredo	Escudo Sul Rio grandense
20/09/09	Santana da Boa Vista,	Parque Toca da Tigra	Escudo Sul Rio grandense
20/09/09	Lavras do Sul	Margens do Rio Camaquã	Escudo Sul Rio grandense
14/01/10	Encruzilhada do Sul	Cerro Partido	Escudo Sul Rio grandense
14/01/10	Pinheiro Machado	Parque Charrua	Escudo Sul Rio grandense
15/04/10	Barra do Ribeiro	Praia Canto das Mulatas	Litoral Médio
15/04/10	Viamão	Parque Saint Hilaire	Litoral Médio
15/04/10	Tapes	Praia dos Pinheirais	Litoral Médio
27/05/10	Mostardas	Parque Nacional da Lagoa do Peixe	Litoral Médio
27/05/10	São José do Norte	Barranco	Litoral Médio
12/07/10	Tavares	Lagoa dos Patos	Litoral Médio
12/07/10	Capivari do Sul	Parque Municipal	Litoral Médio
12/07/10	Palmares do Sul	Lagoa do Cipó	Litoral Médio