



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

**MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Phaffia rhodozyma*
(*Xanthophyllomyces dendrohous*) UTILIZANDO ÁGUA DE PARBOILIZAÇÃO DO
ARROZ**

Eng^a. Danielle Alves da Silva

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

**RIO GRANDE, RS
2009**

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

**MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Phaffia rhodozyma*
(*Xanthophyllomyces dendrohous*) UTILIZANDO ÁGUA DE PARBOILIZAÇÃO DO
ARROZ**

Eng^a. Danielle Alves da Silva

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Engenharia e Ciência
de Alimentos

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

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2009

Dedico este trabalho às pessoas que foram e sempre serão os maiores exemplos em
minha vida: José Carlos e Sônia Maria.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Carlos e Sônia Maria, por acreditarem em mim e serem a base de todas as minhas conquistas. Sem eles, eu nada conseguiria; para eles, meu amor e minha gratidão eterna.

Meus irmãos Débora e Douglas, por sempre se fazerem presentes, pela preocupação, apoio e amor.

Ao Renato, pelo amor acima de qualquer circunstância, pelo apoio e pela força, pelo companheirismo, pela cumplicidade, pelo carinho, pelas visitas inesperadas e por todos os momentos compartilhados à distância.

Minhas amigas de longas datas e outras que, apesar do pouco tempo de convívio, se fizeram tão importante nessa jornada: Celina, Fernanda, Camila, Anna Rafaela, Alice, Nágela, Marianne, Elisane e Thais, por todo apoio e amizade.

Ao meu braço direito e amiga de todas as horas: Thais. Com toda certeza é uma pessoa que levarei sempre comigo, por toda dedicação e responsabilidade, como poucas vezes pude ver.

À família Braga: Rafa, Ítalo e Tatá, obrigada por tudo e por coisas que nem mesma eu saberia como agradecer.

Meus colegas de mestrado: Ana Paula, Jéferson, Sidnei, Cíntia, Elisane, André, Anna Rafaela e Kessiane, obrigada por todos os momentos divididos, desde as aulas até as festinhas inesquecíveis.

Ao pessoal do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos: Mariano, Nina, Thais, Renata. Em especial a Elisane e o André, pessoas que deram mais leveza e descontração ao dia-a-dia.

Ao Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Micotoxinas por disponibilizar equipamentos fundamentais para realização desse trabalho e pela atenção dispensada.

À prof^a Eliana, que me ajudou em todos os momentos que precisei, exercendo seu trabalho de forma excepcional, além de ser um exemplo de ser humano.

À minha orientadora Janaína, pela constante atenção ao longo do trabalho, contribuindo para minha formação profissional, pela amizade e preocupação.

À minha co-orientadora Susana, pelas sugestões nos momentos certos, pela orientação e por ser mais que uma profissional, por ser uma pessoa genuína, com o dom de saber ouvir e tratar a todos com igualdade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	13
INTRODUÇÃO	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. OBJETIVOS	16
1.1.1. Objetivo geral	16
1.1.2. Objetivos específicos	16
CAPÍTULO II	17
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Estrutura dos carotenóides	18
2.2. Propriedades e funções dos carotenóides	20
2.3. Fontes de carotenóides	21
2.4. Biossíntese de carotenóides	21
2.5. Astaxantina	22
2.6. Microrganismos produtores de carotenóides	25
2.7. Produção de astaxantina	27
2.8. Efluente da parboilização do arroz	35
2.9. Considerações gerais	36
CAPÍTULO III	37
MATERIAL E MÉTODOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Seleção do microrganismo	38
3.1.1. Preparo do inóculo	38
3.1.2. Bioprodução de carotenóides para seleção da cepa de <i>Phaffia rhodozyma</i>	39
3.2. Maximização da bioprodução de astaxantina a partir da <i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL-Y 17268	39
3.3. Métodos analíticos	41
3.3.1. Determinação da concentração de biomassa	41
3.3.2. Determinação da concentração de sacarose	42

3.3.3. Determinação do pH _____	42
3.3.4. Determinação da concentração de astaxantina _____	42
3.4. Caracterização parcial do efluente _____	43
3.4.1. Determinação da concentração de carbono e hidrogênio _____	43
3.4.2. Determinação da concentração de nitrogênio _____	43
3.4.3. Determinação da concentração de açúcares totais _____	43
3.4.4. Determinação da concentração de fósforo _____	43
3.4.5. Determinação da concentração de sólidos solúveis totais _____	43
3.4.6. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) _____	44
CAPÍTULO IV _____	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	46
4.1. Seleção do microrganismo _____	46
4.2. Caracterização parcial do Efluente _____	51
4.3. Maximização da bioprodução de astaxantina pela levedura <i>Phaffia</i>	
<i>rhodozyma</i> NRRL Y-17268 _____	53
4.3.1. Planejamento fracionário 2_{IV}^{6-2} _____	53
4.3.2. Teste de Tukey com extrato de levedura _____	62
4.3.3. Planejamento fatorial completo 2^4 _____	65
CAPÍTULO V _____	79
CONCLUSÕES _____	79
5. CONCLUSÕES _____	80
5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____	81
CAPÍTULO VI _____	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	83
ANEXOS _____	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos produtores de carotenóides.....	27
Tabela 2: Produção volumétrica e específica de astaxantina por <i>Phaffia rhodozyma</i> em diferentes fontes de carbono.	29
Tabela 3: Distribuição dos carotenóides (%) das cepas no meio de cultura contendo glicose, sacarose ou xilose.....	32
Tabela 4: Caracterização físico-química do efluente da parboilização de arroz.	36
Tabela 5: Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{6-2} com valores reais e codificados.	40
Tabela 6: Matriz do planejamento experimental fracionário 2^4 com valores reais e codificados.	41
Tabela 7: Resultados máximos obtidos para biomassa e bioprodução de astaxantina para as 3 cepas estudadas, utilizando glicose e sacarose.	49
Tabela 8: Caracterização parcial do efluente de parboilização do arroz centrifugado.	52
Tabela 9: Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{6-2} com valores reais e codificados, concentração máxima de biomassa, produção máxima de astaxantina específica e produção máxima de astaxantina volumétrica.	54
Tabela 10: Teste de Tukey para as diferentes concentrações de extrato de levedura na bioprodução de astaxantina.	64
Tabela 11: Matriz do planejamento experimental fracionário 2^4 com valores reais e codificados, concentração máxima de biomassa, produção máxima de astaxantina específica e produção máxima de astaxantina volumétrica.	66
Tabela 12: Coeficientes de regressão e erro padrão para produção de astaxantina volumétrica.....	71
Tabela 13: Análise de variância para bioprodução de astaxantina volumétrica do planejamento experimental completo 2^4	72
Tabela 14: Produção específica e volumétrica de astaxantina por cepas selvagens e mutantes de <i>Phaffia rhodozyma</i>	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica dos carotenóides.....	18
Figura 2: Estrutura química de alguns carotenóides.....	19
Figura 3: Últimos estágios da biossíntese de carotenóides e suas possíveis transformações.	22
Figura 4: Estrutura química da astaxantina.....	23
Figura 5: Biossíntese de astaxantina em <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (<i>Phaffia rhodozyma</i>). HDCO = 3-OH-3',4'-dideidro- β - ψ -caroteno-4-ona.	25
Figura 6: Média do acompanhamento da produção de biomassa, pH, astaxantina específica e volumétrica ao longo do cultivo para as cepas estudadas utilizando glicose.....	46
Figura 7: Média do acompanhamento da produção de biomassa, pH, astaxantina específica e volumétrica ao longo do cultivo para as cepas estudadas utilizando sacarose.	48
Figura 8: Varredura em espectrofotômetro (<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-17268 em meio contendo sacarose).	51
Figura 9: Acompanhamento da produção de biomassa, do pH, da produção de astaxantina específica e da astaxantina volumétrica ao longo do cultivo para o planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{6-2} : ensaio 1 ao 5 (a), ensaio 6 ao 10 (b), ensaio 11 ao 15 (c) e ensaio 16 ao 20 (d).	57
Figura 10: Efeitos principais na bioprodução de astaxantina para: produção de biomassa (a); produção de astaxantina específica (b); produção de astaxantina volumétrica (c). * $p < 0,1$, ** $p < 0,15$	60
Figura 11: Acompanhamento da média da produção de biomassa, da produção de astaxantina específica, astaxantina volumétrica e variação do pH ao longo do cultivo para o teste com as diferentes concentrações de extrato de levedura.	63
Figura 12: Acompanhamento da produção de biomassa, da produção de astaxantina específica, da astaxantina volumétrica e da variação do pH, ao longo do cultivo para o planejamento experimental completo 2^4 : ensaio 1 ao 5 (a); ensaio 6 ao 10 (b); ensaio 11 ao 15 (c); e ensaio 16 ao 20 (d).....	68
Figura 13: Efeitos principais e de interação na bioprodução de astaxantina para: produção de biomassa (a); produção de astaxantina específica (b); produção de astaxantina volumétrica (c). * $p < 0,05$	70
Figura 14: Superfícies de contorno para a produção de astaxantina volumétrica como função da concentração do extrato de malte e da peptona; do extrato de malte e da	

sacarose; do extrato de malte e do efluente; da peptona e da sacarose; da peptona e do efluente; da sacarose e do efluente.....	74
Figura 15: Acompanhamento cinético do ensaio 2 do planejamento completo 2^4	75
Figura 16: Superfície de resposta com as variáveis sacarose e efluente de parboilização do arroz fixadas no nível -1.	76
Figura 17: Cultivo submerso da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-17268.	76

RESUMO

O interesse na produção de astaxantina por fontes naturais vem aumentando significativamente nos últimos anos, devido a possibilidade de atuar como corante e sua capacidade antioxidante biológica potente. É o carotenóide principal encontrado na levedura *Phaffia rhodozyma*, sendo esse microrganismo adequado para o uso como fonte do pigmento industrial em razão de seu metabolismo heterotrófico, padrão de crescimento relativamente rápido, qualidade nutricional e seguro como aditivo alimentar. A presente dissertação teve como objetivo principal realizar 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 a produção de astaxantina, utilizando glicose e sacarose como fonte de carbono. Os cultivos foram realizados em frascos agitados a 25°C, 150rpm, por um período de 168h. 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 7,0g.L⁻¹ de biomassa, 350,2µg.g⁻¹ de produção de astaxantina específica e 2,4µg.mL⁻¹ de astaxantina volumétrica, utilizando sacarose. Utilizou-se a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta para verificar os efeitos das variáveis em estudo e as condições que levaram a melhor bioprodução da astaxantina. 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 10g.L⁻¹), extrato de malte (1 a 10g.L⁻¹), peptona (1 a 10g.L⁻¹), sacarose (5 a 20g.L⁻¹), efluente da parboilização do arroz (0 a 180g.L⁻¹) e o pH inicial do meio (4 a 6), tendo como resposta a produção de biomassa, produção de astaxantina específica e produção de astaxantina volumétrica. Os valores máximos obtidos foram 8,9g.L⁻¹ de biomassa, 538,4µg.g⁻¹ de astaxantina específica e 3,1µg.mL⁻¹ de astaxantina volumétrica, em diferentes condições de composição de meio de cultivo. O extrato de levedura não apresentou efeito significativo em nenhuma das respostas avaliadas, sendo realizado um teste de Tukey na faixa de 0 a 1g.L⁻¹. A concentração de extrato de levedura não apresentou 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 16,25g.L⁻¹), sacarose (15 a 35g.L⁻¹), peptona (8,75 a 16,25g.L⁻¹) e o pH mantido no ponto central 5,0. A partir dos resultados, verificou-se um incremento na concentração máxima de biomassa obtida, alcançando 10,9g.L⁻¹ e na produção de astaxantina específica para 628,8µg.g⁻¹. As melhores condições encontradas através das superfícies de resposta para maximização da produção de astaxantina volumétrica foram: 16,25g.L⁻¹ de extrato de malte, 8,75g.L⁻¹ de peptona, 15g.L⁻¹ de sacarose e 87,5g.L⁻¹ de água de parboilização do arroz, alcançando em torno de 5,4µg.mL⁻¹.

Palavras-chave: *Phaffia rhodozyma*, astaxantina, planejamento experimental.

ABSTRACT

The interest in astaxanthin production by natural sources has increased significantly in the last few years, because of its possibility of acting as colorants and its powerful biological antioxidant capacity. It's the most important carotenoid found in the yeast *Phaffia rhodozyma* and this microorganism is appropriate to use in the source of industrial pigment due to its heterotrophic metabolism, relatively rapid growth, nutritional quality and safe as a food additive. The present dissertation had as main objective, through fermentation, using the yeast *Phaffia rhodozyma* studying different culture medium and the rice parboilization wastewater as a substrate. Firstly, the greatest astaxanthin producer, using glucose and sucrose as carbon source was selected amongst three strains of *Phaffia rhodozyma*: NRRL Y-17268, NRRL Y-10921 and NRRL Y-10922. The cultivation condition was realized in a rotatory flasks, at 25°C, 150rpm, for 168h. Through the accompaniment of the bioproduction of astaxanthin, the yeast *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 was selected, because it stood out as a good producer of the carotenoid, 7.0g.L⁻¹ of biomass, 350.2µg.g⁻¹ of specific production of astaxanthin and 2.4µg.mL⁻¹ of volumetric production of astaxanthin, using sucrose. The techniques of experimental design and analysis of response surfaces were used to verify the effects of the studied variables and the conditions which led to the best production of astaxanthin. A fractional experimental design 2_{IV}⁶⁻² was used to determine the independent variables that most influenced in the production of astaxanthin. The studied independent variables were yeast extract concentration (1 to 10g.L⁻¹), malt extract (1 to 10g.L⁻¹), peptone (1 to 10g.L⁻¹), sucrose (5 to 20g.L⁻¹), rice parboilization wastewater (0 to 180g.L⁻¹) and the initial pH (4 to 6), having as answer the biomass production, specific production of astaxanthin and volumetric production of astaxanthin. The highest values obtained were 8.9g.L⁻¹ of biomass, 538.4µg.g⁻¹ of specific astaxanthin and 3.1µg.mL⁻¹ of volumetric astaxanthin, in different conditions of composition of cultivation medium. The yeast extract didn't show significant effect in any answer, being made a Tukey test in the range of 0 to 1g.L⁻¹. In this test the yeast extract concentration didn't show significant difference, then it was removed from the cultivation medium. In a second design the range were applied: malt extract concentration (8.75 to 16.25g.L⁻¹), sucrose (15 to 35g.L⁻¹), peptone (8.75 to 16.25g.L⁻¹) and the pH was maintained in the central point (5.0). From the results, verify an increase in the maximum biomass concentration obtained, reaching 10.9g.L⁻¹ and in a specific production of astaxanthin to 628.8µg.g⁻¹. The better conditions found through of response surface to the maximization of volumetric production of astaxanthin was: 16.25g.L⁻¹ of malt extract, 8.75g.L⁻¹ of peptone, 15g.L⁻¹ of sucrose and 87.5g.L⁻¹ of rice parboilization waste water, reaching around 5.4µg.mL⁻¹

Keywords: *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, experimental design.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto- β -caroteno) é um carotenóide oxigenado, de coloração rosa-alaranjado, amplamente distribuído na natureza. É um dos maiores pigmentos da família dos carotenóides usado para prover a coloração característica em alguns pássaros, crustáceos (camarão e lagosta), peixes (truta e salmão), pássaros (flamingo), algas (*Haematococcus pluvialis*) e na levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, popularmente conhecida como *Phaffia rhodozyma* (HU *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2006; LIU & WU, 2007, NI *et al.*, 2008).

Além do aspecto pigmentar, a astaxantina possui outras diversas funções biológicas que têm atraído cada vez mais o interesse por esse carotenóide. Dentre tantas funções benéficas, está a proteção contra danos induzidos pela luz e pelo oxigênio, atuam como antioxidante e fonte de vitamina A, aumentando as respostas imunológicas em animais e humanos (HU *et al.*, 2006; NI *et al.*, 2008).

Estudos sugerem que a astaxantina pode ser aproximadamente 1000 vezes mais eficiente como antioxidante do que a vitamina E e possui uma capacidade de 100-500 vezes maior em combater radicais livres quando comparada com o α -tocoferol (LIM *et al.*, 2002). Além disso atua como inibidora da atividade do oxigênio livre, pelo menos 10 vezes mais que o β -caroteno (NAGUIB, 2000). Provavelmente devido a este fato, a astaxantina teve um aumento de valor no mercado para as indústrias nutracêutica e alimentar.

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

A levedura *P. rhodozyma* se destaca como fonte de pigmento industrial em razão de seu metabolismo heterotrófico, padrão de crescimento relativamente rápido, habilidade para alcançar alta densidade celular em fermentadores industriais, qualidade nutricional e segurança como aditivo alimentar (BONFIM, 1999), possuindo a aprovação como um microrganismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) nos Estados Unidos. Portanto, a produção de astaxantina a partir de fontes naturais, como esta levedura, é uma alternativa em potencial para a substituição da obtida por via sintética (NI *et al.*, 2008).

Devido o incremento do mercado mundial, o alto custo da produção de astaxantina sintética, a necessidade de obtenção do pigmento de fontes naturais com

baixo custo e alta produtividade, a levedura *Phaffia rhodozyma* vem sendo estudada abordando aspectos do processo de obtenção do carotenóide como variações nos meios de produção alternativos, com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, condições de cultivo como pH, temperatura, aeração e agitação (PARAJÓ, SANTOS & VÁZQUEZ, 1998 ; PERSIKE *et al.*, 2002; MORIEL *et al.*, 2005; LIU, WU & HO., 2006). Bem como, a realização de estudos comparativos que demonstram maior estabilidade da astaxantina microbiana em relação a obtida sinteticamente (BONFIM, 1999).

Por outro lado, o arroz é o alimento básico mais importante da metade da população mundial e proporciona mais de vinte por cento da ingestão mundial de calorias. Assim como no resto do mundo, no Brasil, 25% do total de arroz produzido é parboilizado. Os quatorze mil produtores de arroz no Rio Grande do Sul geram a metade de toda a produção nacional, tornando-o o maior produtor no Brasil (FARIA *et al.*, 2006).

O processo de parboilização utiliza 1,12L de água, gerando 0,83L de efluente por quilograma de arroz, que contém altas cargas de substâncias orgânicas e nutrientes (FARIA *et al.*, 2006). A água de encharcamento gerada durante a parboilização é um ponto crítico do processo, pois possui alta demanda bioquímica de oxigênio. Muitas destas indústrias de beneficiamento podem descarregar esta água diretamente sobre rios e riachos, ocasionando um impacto ambiental conhecido como eutrofização, causando interferências com os usos desejáveis do corpo d'água.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a bioprodução do carotenóide astaxantina por cultivo submerso da levedura *Phaffia rhodozyma*, aproveitando o efluente da parboilização do arroz como substrato no meio de produção.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral utilizar o processo de cultivo submerso para a produção de biomassa rica em astaxantina a partir da levedura *Phaffia rhodozyma*, maximizando a bioprodução deste carotenóide, empregando a água de parboilização do arroz.

1.1.2. Objetivos específicos

- Selecionar dentre as cepas de *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268, NRRL-Y 10921 e NRRL-Y 10922 a mais promissora quanto a bioprodução de astaxantina, estudando a glicose e a sacarose como fonte de carbono para os diferentes microrganismos.
- Produzir astaxantina por cultivo submerso aproveitando a água de parboilização do arroz como substrato.
 - Estudar a influência das concentrações de extrato de levedura, extrato de malte, peptona, sacarose, efluente de parboilização do arroz e do pH inicial do meio na bioprodução do carotenóide, realizando um planejamento experimental fracionário 2_V^{6-2} .
 - Avaliar através de um teste de Tukey diferentes concentrações de extrato de levedura (0, 0,5 e 1 g.L⁻¹), para a continuidade do uso na sequência da metodologia de planejamento experimental;
 - Estudar através de um planejamento experimental completo 2^4 , as condições para uma maximização da produção de astaxantina, tendo como variáveis a concentração dos componentes do meio de bioprodução: extrato de malte, peptona, sacarose e efluente da parboilização do arroz.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este item apresenta informações sobre a bioprodução de carotenóides, abordando suas estruturas, propriedades e funções, suas fontes de obtenção, a biossíntese, aspectos específicos da astaxantina, microrganismos produtores de carotenóides e a produção da astaxantina.

2.1. Estrutura dos carotenóides

Os carotenóides são uma extensa classe estrutural de compostos caracterizados pela presença de uma cadeia poliênica conjugada. As variações estruturais encontram-se na extremidade da cadeia podendo apresentar anéis ou terminação poliênica. A Figura 1 apresenta a estrutura central poliênica, a seqüência de unidades terpenóides e algumas das mais comuns terminações de cadeia encontradas nos diversos carotenóides (SCHWARTZ, 2003).

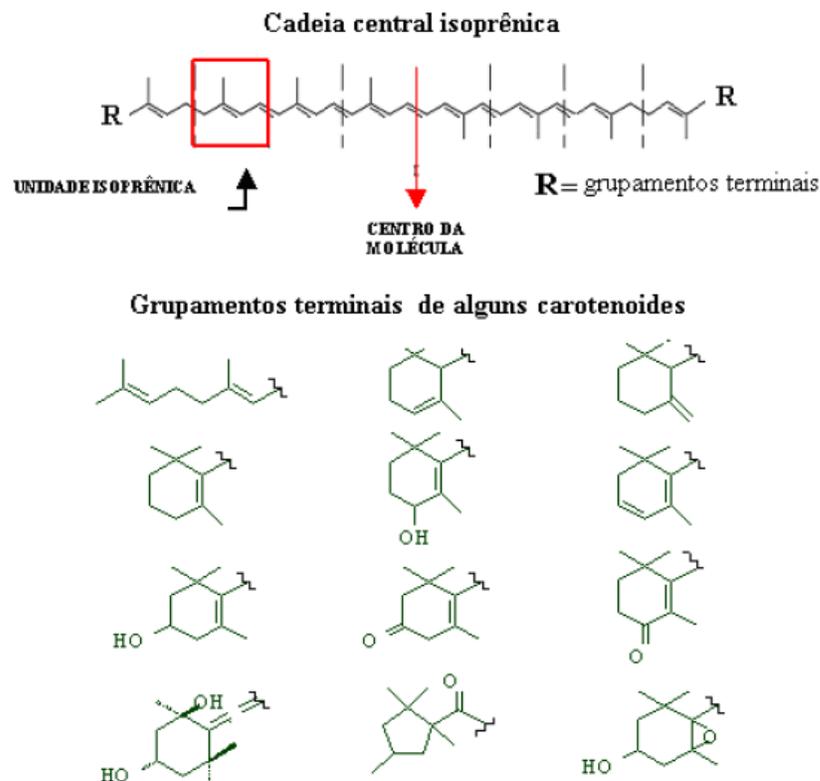


Figura 1: Estrutura básica dos carotenóides.

Fonte: SCHWARTZ, 2003.

Os carotenóides são usualmente tetraterpenóides (C_{40}) constituídos de oito unidades isoprenóides (C_5) unidas. A estrutura linear básica é simétrica e pode apresentar-se com uma ou ambas as extremidades cíclicas. Nestes compostos, as unidades de isopreno apresentam no meio da molécula, nas posições 1:6, dois grupamentos metílicos, enquanto todos os outros grupos metílicos da cadeia lateral ocupam a posição 1:5.

Todos os carotenóides podem ser considerados como derivados do licopeno ($C_{40}H_{56}$) por reações envolvendo: ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração da dupla ligação, redução ou extensão da cadeia, migração do grupo metil, rearranjo, isomerização, introdução de função oxigenada ou combinação destes processos dão origem a um extenso número de estruturas. Suas distintas características devem-se a presença das ligações duplas conjugadas na cadeia. Essas ligações servem como absorvedores cromóforos de luz e atribuem a estes compostos cores que variam desde o amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho (DELGADO-VARGAS, JIMENEZ & PAREDES-LÓPEZ, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Algumas estruturas químicas de carotenóides são mostradas na Figura 2.

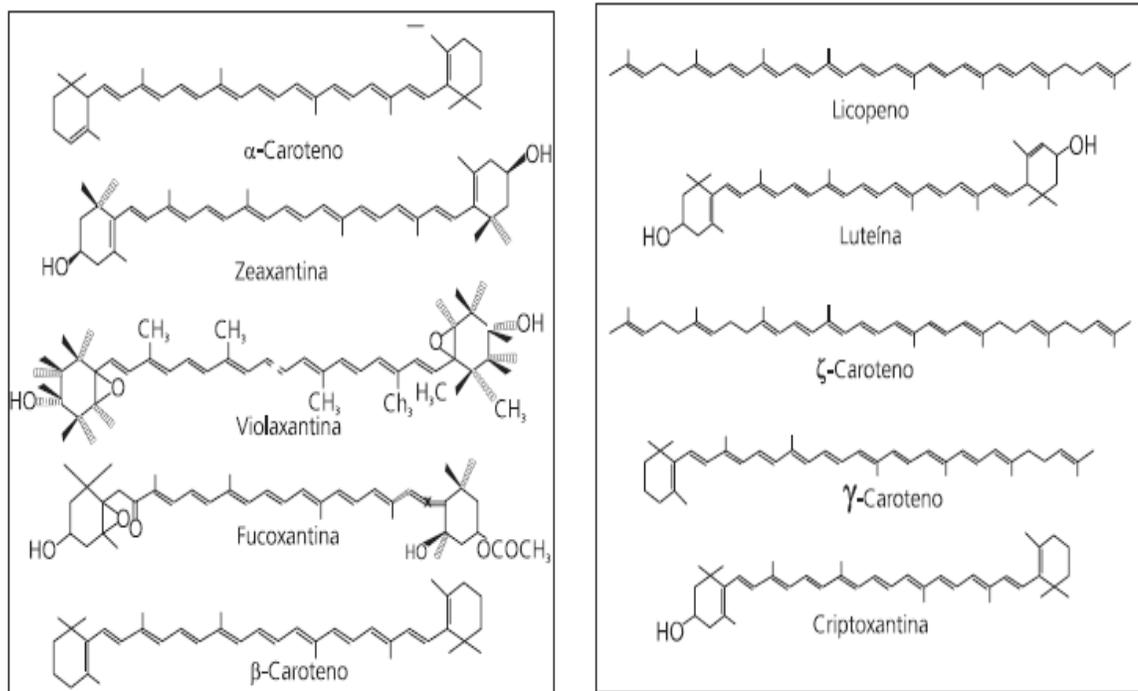


Figura 2: Estrutura química de alguns carotenóides.

Fonte: AMBRÓSIO, CAMPOS & FARO, 2006.

Em decorrência da presença das insaturações, os carotenóides são sensíveis à luz, temperatura e acidez, que causam isomerização dos carotenóides *trans*, a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda na cor e na atividade pró-vitamínica. São também susceptíveis as oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, reação esta que depende da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, prooxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz. Estes pigmentos são compostos hidrofóbicos, lipofílicos, insolúveis em água e solúveis em solventes, como acetona, álcool e clorofórmio (MALDONADE, 2003; AMBRÓSIO, CAMPOS & FARO, 2006).

Segundo Alves (2005), os carotenóides são classificados por sua estrutura química em carotenos que são constituídos por carbono e hidrogênio e oxicarotenóides ou xantofilas que possuem carbono, hidrogênio e oxigênio, estando a astaxantina incluída nesse grupo. Os pigmentos carotenóides podem ainda ser classificados como primários ou secundários. Os carotenóides primários agrupam os compostos requeridos pelas plantas na fotossíntese (β -caroteno, violaxantina e neoxantina), enquanto que os carotenóides secundários estão localizados nas frutas e flores (α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, capsantina, capsorubina).

2.2. Propriedades e funções dos carotenóides

Os carotenóides constituem uma das mais valiosas classes de compostos para aplicações nas indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos. Nas indústrias de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corantes, para colorir e/ou uniformizar a cor perdida durante o processamento e armazenagem (MALDONADE, 2003). São também precursores de compostos voláteis, contribuindo para o sabor e aroma dos alimentos. Nas indústrias de ração, esses pigmentos também são utilizados como corante, com a finalidade de promover a pigmentação adequada dos animais (SCHROEDER & JOHNSON, 1995 (a)).

O aspecto da cor motiva o consumidor e agrega valor comercial ao produto, porém os carotenóides também possuem atividades biológicas importantes. Particularmente aqueles que são precursores da vitamina A, tem tido um reconhecimento aumentado nos últimos anos devido aos mesmos serem relatados como benéficos à saúde humana (KRINSKY, 1991; MALDONADE, 2003). Dentre os benefícios estão o aumento do sistema imunológico e a redução o risco de doenças

degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata (AMAR *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, os carotenóides têm sido vendidos como pó seco ou extratos de plantas, assim como o urucum, a páprica e o açafrão. A desvantagem dos corantes naturais obtidos de plantas, é que sofrem uma diminuição ou instabilidade da matéria-prima, sujeito pelas condições climáticas, bem como pela variação do nível de coloração e qualidade do produto final (MALDONADE, 2003).

2.3. Fontes de carotenóides

Mais de 700 carotenóides já foram identificados e estão amplamente distribuídos no reino vegetal e animal, que representam uma extensa família de produtos naturais. Podem ser encontrados nos cloroplastos das plantas fotossintéticas, nos cromoplastos das flores, frutos, folhas e em insetos, podendo ser biossintetizados por algumas bactérias, fungos e algas (AMBRÓSIO, CAMPOS & FARO, 2006; BJERKENG *et al.*, 2007).

Os carotenóides mais facilmente encontrados nos alimentos vegetais são o β -caroteno (cenoura, *Daucus carota*), licopeno (tomate, *Lycopersicum esculentum*), várias xantofilas (zeaxantina, luteína e outras estruturas oxigenadas do milho, *Zea mays*; da manga, *Mango indica*; do mamão, *Carica papaya* e da gema de ovo) e a bixina (aditivo culinário e corante dérmico usado por indígenas amazônicos, obtido do urucum, *Bixa orellana*). Outras ocorrências naturais de uso culinário são a capsaxantina e capsorubina (páprica, *Capsicum annuum*) e a crocina (açafrão, *Crocus sativus*). Ainda ocorrem naturalmente em determinados tecidos animais como pele, plumas e carapaça que além de proteção antioxidante, integra a complexa rede de sinais de comunicação envolvidos na atração, advertência e camuflagem.

Embora os animais sejam incapazes de sintetizar os carotenóides, estes são normalmente encontrados em algumas espécies, como resultado de sua dieta, podendo encontrar-se seletivamente absorvido e acumulado de forma inalterada ou levemente modificado.

2.4. Biossíntese de carotenóides

A biossíntese dos carotenóides em plantas tem sido estudada há mais de 50 anos. As unidades isoprenóides formam a estrutura básica de todos os

terpenóides, dos quais fazem parte os carotenóides. A associação desta matriz “monômero” leva à formação de compostos C₁₀, C₁₅, C₂₀. A dimerização do composto C₂₀ leva ao fitoene (C₄₀), o primeiro composto da família dos carotenos. As transformações sucessivas, como também as prováveis rotas de formação dos inúmeros carotenos encontram-se esquematicamente representadas na Figura 3, onde a reação corresponde à (1) desaturação, (2) ciclização, (3) hidroxilação, (4) epoxidação, (5) rearranjo epóxido-furanóxico (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

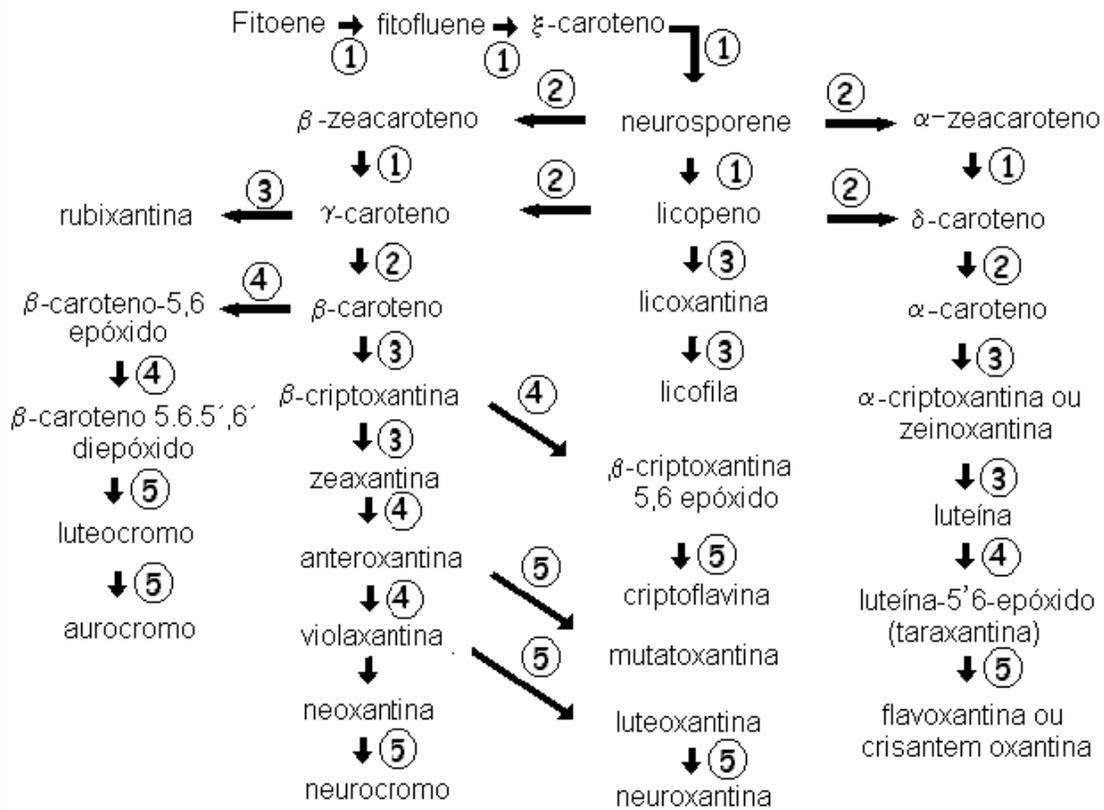


Figura 3: Últimos estágios da biossíntese de carotenóides e suas possíveis transformações.

Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, 2001.

2.5. Astaxantina

A astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-diceto-β-caroteno) é um pigmento carotenóide oxigenado que apresenta uma forte atividade de eliminar radicais livres e protege contra peroxidação de lipídios e danos causados pela oxidação das membranas celulares e tecidos.

É um cetocarotenóide que contém 40 átomos de carbono ($C_{40}H_{52}O_4$) de peso molecular 596,86 (PASSOS, 2007). Sua estrutura química é caracterizada por uma longa cadeia hidrocarbonada, com duplas ligações conjugadas (cadeia poliênica) com um anel aromático em cada extremidade da cadeia.

A presença de hidroxila (-OH) e oxigênio nos anéis terminais da estrutura química da astaxantina confere uma maior polaridade a este carotenóide quando comparado aos demais. Assim, sua estrutura se orienta de maneira que os dois anéis se localizem na superfície e a cadeia carbonada no interior da membrana (GOTO *et al.*, 2001). A Figura 4 apresenta a estrutura química da astaxantina.

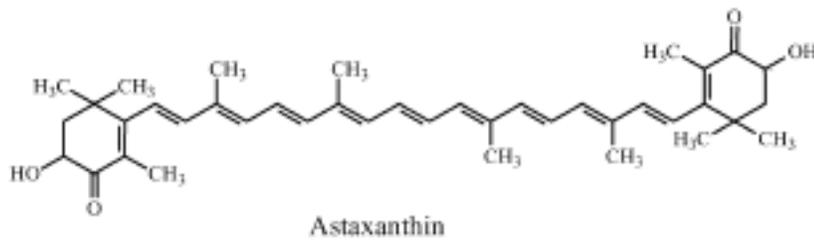


Figura 4: Estrutura química da astaxantina.

Fonte: LAI *et al.*, 2004.

A astaxantina é um pigmento produzido por plantas, algas e fungos pertencente à família das xantofilas. Está presente em pássaros (flamingo), peixes (salmão e a truta) e frutos-do-mar (camarão, lagosta e caranguejo) que acumulam este carotenóide após o consumo de algas sintetizadoras de astaxantina (HIGUERA-CIAPARA, FÉLIX-VALENZUELA & GOYCOOLEA, 2006).

A astaxantina possui inúmeras propriedades farmacológicas incluindo atividades antioxidante, antiinflamatória, imunomoduladora, anticâncer, antidiabetes, prevenção de doenças cardiovasculares, prevenção de catarata e na bioatividade contra *Helicobacter pylori*. Entre tais propriedades, sua atividade antioxidante parece ser responsável pelas demais. Essa atividade tem levado à sua introdução no promissor mercado de nutracêuticos, sendo comercializada em cápsulas (HIGUERA-CIAPARA, FÉLIX-VALENZUELA & GOYCOOLEA, 2006). Estudos *in vitro* demonstraram efeito contra a foto-oxidação induzida por radiação UV superior ao β -caroteno e luteína (O'CONNOR & O'BRIEN, 1998). Também demonstrou excelente ação na proteção de lipídios contra peroxidação (NAGUIB, 2000).

Seu potencial antioxidante é superior a outros carotenóides como zeaxantina, luteína, cantaxantina e β -caroteno e 100 vezes maior que o α -tocoferol (NAGUIB, 2000). Essa superioridade estaria relacionada à estrutura química, onde os anéis polares da astaxantina removeriam espécies reativas de oxigênio na superfície, enquanto a cadeia carbonada agiria no interior da membrana (GOTO *et al.*, 2001). No anel polar da astaxantina, o grupo hidroxila no átomo de carbono 3 é apontado como principal sítio de remoção de radicais livres (AUGUSTI, 2007).

A astaxantina interage fortemente com “carreadores” naturais (carotenoproteínas) através de sítios de acomodação em certos domínios da molécula protéica. Como exemplo desse fenômeno pode-se citar a firme fixação da astaxantina na carne do salmão e na carapaça de crustáceos como o camarão e a lagosta. A ligação e a dissociação do pigmento são acompanhados de efeito batocrômico: as carapaças frescas de crustáceos nos parecem mais cinzas-azuladas enquanto que, após o cozimento, tingem-se mais fortemente em vermelho rosado.

A primeira etapa da biossíntese da astaxantina (Figura 5) envolve a formação de geranylgeranyl pirofosfato e na sua conversão em fitoeno (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- ψ,ψ -caroteno), através da ação da enzima fitoeno sintetase. Esse primeiro caroteno não apresenta coloração. Através de uma série de desidrogenações, outros carotenos são formados. Em *Phycomyces*, 4 desidrogenações resultam na formação do licopeno (ψ,ψ -caroteno), que é o pigmento característico do tomate. A formação de anéis β nas extremidades da estrutura ocasiona a formação do β -caroteno, pigmento característico da cenoura.

A biossíntese deste carotenóide por *Xanthophyllomyces dendrohous* (*Phaffia rhodozyma*) pode ocorrer de duas maneiras. Em ambas as vias ocorrem oxidação do carbono 4 em um dos anéis do β -caroteno ou no anel do toruleno (3',4'-dideidro- β - ψ -caroteno), introduzindo um grupo ceto. Antes que ocorra a oxidação do segundo C-4 do outro anel de β -caroteno para formar outro grupo ceto, ocorre a hidroxilação do C-3 no mesmo anel, permitindo a formação dos intermediários 3-OH-equinenona (β,β -caroten-4-ona) e 3-OH-3',4'-dideidro- β - ψ -caroteno-4-ona (HDCO), do β -caroteno e toruleno, respectivamente. O intermediário 3-OH-equinenona sofre oxidação, seguida de hidroxilação do anel β' , formando a trans astaxantina. Na outra via alternativa, o HDCO também sofre oxidação, seguida de hidroxilação no anel β' , formando a cis astaxantina (ANDREWS, PHAFF & STARR, 1976; JOHNSON, CONKLIN & LEWIS, 1979).

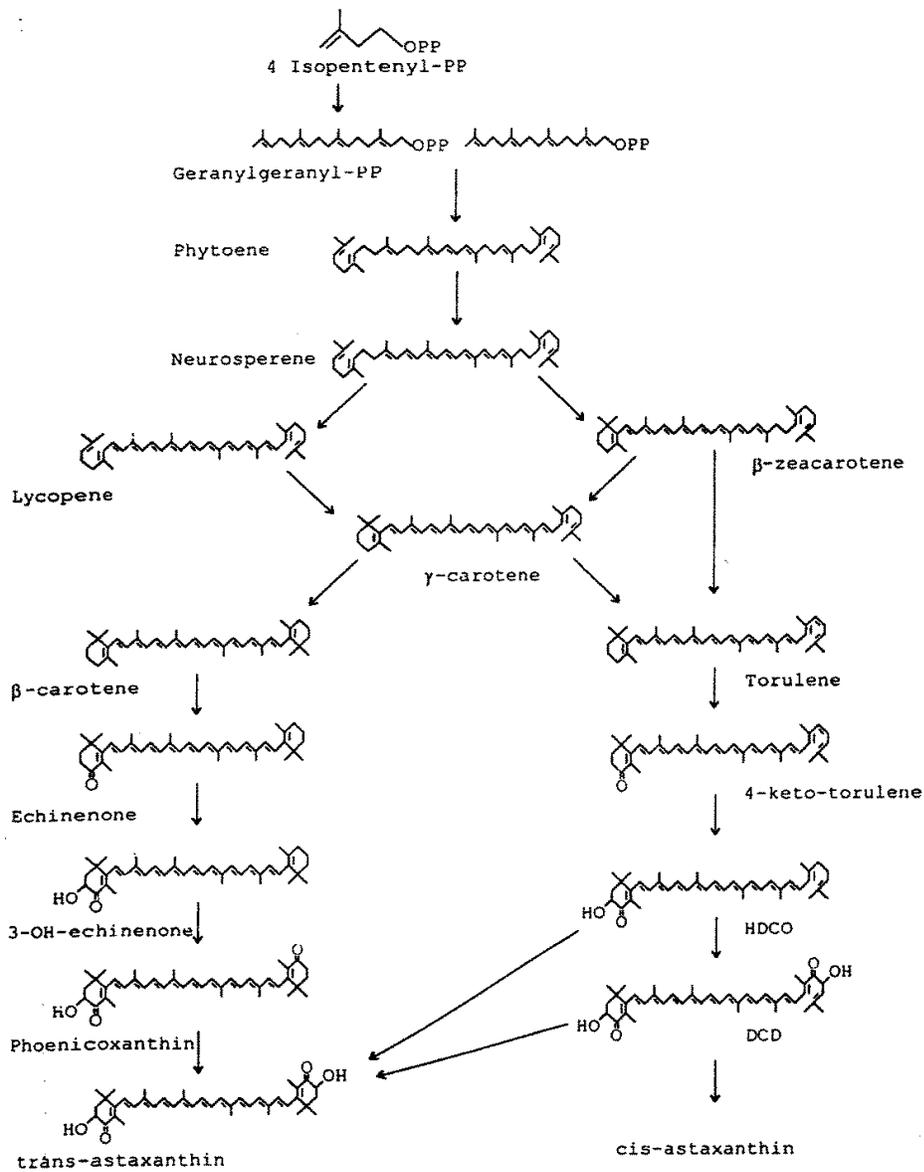


Figura 5: Biossíntese de astaxantina em *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). HDCO = 3-OH-3',4'-didehidro-β-ψ-caroteno-4-ona.

Fonte: MALDONADE, 2003.

2.6. Microrganismos produtores de carotenóides

Os carotenóides de fontes microbiológicas têm atraído muita atenção nos últimos anos. A principal razão para o interesse em usar microrganismos para produzirem compostos em relação aos isolados de plantas e animais ou sintetizados

quimicamente é a facilidade de aumentar a produção microbiana pelas condições de cultivo e pela manipulação genética.

Os tipos de carotenóides e as quantidades produzidas podem variar dependendo do microrganismo, meio de cultura e condições operacionais (temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade). Muitos dos estudos são realizados destinados a otimização das condições de cultura que diretamente afetam o crescimento dos microrganismos e a produção de carotenóides (VALDUGA *et al.*, 2009).

Muitos microrganismos são produtores de carotenóides e, portanto, biotecnologicamente interessantes, como é o caso do fungo *Blakeslea trispora* e da microalga marinha *Dunaliella*, que são produtores de β -caroteno. No entanto, a utilização comercial de microrganismos com potencial biotecnológico para produzir carotenóides é limitado pelo alto custo de produção, que poderiam ser minimizados por otimização de processo, utilização de culturas hiperprodutoras de pigmentos e uso de fontes de nutrientes mais baratas (MALDONADE, 2003).

A astaxantina pode ser encontrada naturalmente como pigmento principal somente em alguns microrganismos: microalgas verdes (*Haematococcus sp.* e *Haematococcus pluvialis*), uma bactéria marinha (*Agrobacterium aurantiacum*) e uma levedura (*Phaffia rhodozyma*), que pode conter entre 27% a 63% dos carotenóides totais presentes (JOHNSON & AN, 1991; CHUMPOLKULWONG *et al.*, 1997).

A levedura *Phaffia rhodozyma*, tem sido objeto de numerosos estudos desde que foi descoberta como produtora natural do carotenóide astaxantina (CANNIZZARO *et al.*, 2004), obtendo níveis promissores para produção comercial do pigmento (WANG, YU & ZHOU, 2006).

Esse microrganismo foi isolado no início do ano de 1970 a partir de exudados de árvores passageiras em regiões montanhosas do Japão e Alaska. Foi originalmente designada "*Rhodozyma montanae*", mas suas características incomuns e a falta de uma descrição em latim levou a uma mudança deste gênero para *Phaffia*, em homenagem a Herman Jan Phaff. Desde então basidiósporos e conjugações foram observados na *P. rhodozyma*, o novo nome *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi recentemente proposto para *P. rhodozyma*. A cor da célula intacta da levedura *Phaffia rhodozyma* é laranja para vermelho alaranjado devido à presença de carotenóides, principalmente astaxantina no citoplasma (BONFIM, 1999).

Na Tabela 1 estão apresentados alguns microrganismos tecnologicamente interessantes, com a produção dos principais carotenóides, obtidos pelos processos biotecnológicos.

Tabela 1: Microrganismos produtores de carotenóides.

Espécies	Carotenóides principais
Cianobactéria	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
Algas verdes	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína ((3R,3'R,6'R)- β , ϵ -caroteno-3,3'-diol)
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina
Fungos e leveduras	
<i>Blakeslea trispora</i>	B-caroteno e licopeno
<i>Rhodotorula</i> SP	Toruleno e β -caroteno
<i>Rhodospiridium</i> sp	Toruleno e β -caroteno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Toruleno e torulahodina (3',4'-didehidro- β , ψ -caroten-16'-oico)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina
Bactérias	
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas
<i>Mycobacterium phlei</i>	Xantofilas e β -caroteno
<i>Flavobacterium</i> SP	Zeaxantina e β -caroteno
<i>Deinococcus</i> SP	Derivados 4-ceto do γ -caroteno
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Derivados 4-ceto do γ -caroteno
<i>Brevibacterium</i> SP	Cantaxantina e Astaxantina
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
<i>Mycobacterium brevicai</i>	Cantaxantina
<i>Mycobacterium lactiola</i>	Astaxantina
<i>Pseudomonas</i> SP	Rodoxantina (4',5'-didehidro-4',5'-retro- β , β -caroteno-3,3'-diona)

Fonte: SCHROEDER & JOHNSON, 1995 (a).

2.7. Produção de astaxantina

A produção comercial de carotenóides a partir de microrganismos concorre principalmente com a produção sintética por processos químicos. Atualmente, os

carotenóides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas. Entretanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos.

Comercialmente, os carotenóides são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global de aproximadamente US\$ 935 milhões/ano, sendo que somente a astaxantina representou cerca de US\$ 150 milhões no ano de 2000 e, com um valor expressivo de US\$ 2000/kg (FRASER & BRAMLEY, 2004).

Esse crescimento progressivo alcançado na produção de carotenóides pela via microbiológica intensifica o interesse comercial neste processo comparado com a síntese química. O aumento nas vendas no mercado consumidor é devido a crescente aplicação desses carotenóides nas atividades industriais relacionadas a aqüicultura e avicultura através de sua utilização como suplemento alimentar em dietas especializadas (DEAN, 1992).

Assim, devido ao incremento do mercado mundial, o alto custo da astaxantina sintética e a necessidade de obtenção de astaxantina de fontes naturais, a levedura *Phaffia rhodozyma* vêm sendo estudada, abordando-se aspectos do processo fermentativo como meios de produção alternativos e condições de cultivo como pH, temperatura, aeração e agitação (PARAJÓ, SANTOS & VÁZQUEZ, 1998; PERSIKE *et al.*, 2002; MORIEL *et al.*, 2005; LIU, WU & HO, 2006).

A temperatura ótima de crescimento e biossíntese para a maioria das cepas de *Phaffia rhodozyma* se encontra na faixa de 20 – 25°C, sendo a astaxantina biossintetizada principalmente durante a fase estacionária. O pH ótimo para o crescimento e carotenogênese é de aproximadamente 5,0. A *P. rhodozyma* é um organismo aeróbico cujo crescimento (metabolismo primário) é dependente do suplemento de oxigênio no sistema de cultura (AN, CHO & JOHNSON, 1999; LIU, WU & HO, 2006). Esta levedura pode assimilar uma variedade de fontes de carbono para produção de carotenóide, incluindo glicose, maltose, sacarose, celobiose, xilose, arabinose e lactose como mostra a Tabela 2 (PARAJÓ *et al.*, 1997).

Tabela 2: Produção volumétrica e específica de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* em diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono ou meio de cultura	Produção volumétrica (mg.mL⁻¹)	Produção específica (µg.g⁻¹)
Glicose	1,30 – 10,12	325 – 1633
Celobiose	0,22 – 4,10	270 – 1812
Maltose	1,03 – 5,33	512 – 1317
Sacarose	1,40 – 8,40	508 – 1690
Xilose	0 – 1,48	0 – 819
Arabinose	1,25 – 9,30	1,4 – 1014
Glicose+Frutose	2,8 – 2,9	150 – 1060
Lactose	2,34	1072
Melaço	0,8 – 15,3	444 – 1086
Suco de uva	2,0 – 15,5	120 – 1510
Carboidratos obtidos a partir de hidrolizados de madeira	-	480 – 1567
Água de maceração de milho	0,1 – 2,6	100 – 400

Fonte: PARAJÓ *et al.*, 1997.

O efeito do pH no processo de produção do carotenóide pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* 46 foi avaliado no trabalho de Hu *et al.* (2006) com o meio de cultivo contendo 80g.L⁻¹ de glicose, 8g.L⁻¹ de extrato de levedura, 6g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,1g.L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 0,3g.L⁻¹ de KNO₃, 0,5g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,5g.L⁻¹ de KH₂PO₄.g.L⁻¹. O cultivo foi realizado em agitador rotatório a 200rpm, 20°C durante 7 dias, avaliando os pH iniciais de: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5. Concluiu-se que o pH melhor para o crescimento celular é 6,0 (17,21g.L⁻¹), para a produção de astaxantina específica 4,0 (1,52mg.g⁻¹) e para astaxantina volumétrica 5,0 (20,48mg.L⁻¹).

Nesse mesmo trabalho, foi feito o estudo do controle do pH ao longo do processo de bioprodução, as condições do processo foram realizadas em um reator de 30L, com 20L do mesmo meio de cultivo, na temperatura de 20-22°C, taxa de aeração de 0,5-1,2vvm e agitação de 200-400rpm. Foram avaliados o efeito do pH controlado em 5,0 e sem controle com o pH inicial igual a 5,0. Observou-se que houve um acréscimo de todas as respostas estudadas do cultivo em que o pH inicial foi 5,0 e mantido sem controle durante o processo. A produção de astaxantina volumétrica passou de 15,24mg.L⁻¹ para 21,8mg.L⁻¹, a biomassa foi de 11,61g.L⁻¹ para 16,24g.L⁻¹

no cultivo. Entretanto não houve tanta diferença quanto a produção específica, passando de $1,33\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para $1,35\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Sendo, portanto sugerido que o pH exerce uma forte influência no crescimento celular e na formação da astaxantina (HU *et al.*, 2006).

Utilizando a mutante *Phaffia rhodozyma* 7B12, originada da *Phaffia rhodozyma* Past-1, foram realizados estudos de otimização de fontes de nitrogênio para produção de astaxantina. A primeira etapa do estudo consistiu em definir qual a melhor fonte de nitrogênio, entre elas: carbamida; acetato de amônio; NH_4Cl ; KNO_3 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; amônio oxiláco; peptona; extrato de carne e extrato de levedura. Foram realizados cultivos em agitador rotatório a 200rpm com erlenmeyers de 250mL contendo 25mL de meio de cultivo ($20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose, $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $0,14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ZnCl_2 , $0,27\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1,25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$), a 22°C por 96h. Os melhores resultados obtidos foram utilizando a fonte de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que produziu $5,51\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de astaxantina volumétrica, e o KNO_3 que produziu $1,23\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de astaxantina específica. O extrato de carne proporcionou uma maior quantidade de biomassa de $5,62\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Portanto, essas 3 fontes foram as escolhidas para o planejamento experimental misto, todos estudados na faixa de 0 a $0,667\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Através desse planejamento, observou-se que o máximo valor de astaxantina volumétrica ($6,40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), foi obtido com $0,284\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,323\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KNO_3 e $0,393\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de carne. A condição ótima ($0,28\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de amônio, $0,49\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrato de potássio e $1,19\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de carne) foi levada ao biorreator de 5L, alcançando uma biomassa de $8,36\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, uma produção de astaxantina específica de $1\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e uma produção volumétrica de $7,71\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (NI *et al.*, 2007).

Para avaliação do efeito das fontes de carbono e o delineamento do perfil dos carotenóides produzidos por cepas da levedura *Phaffia rhodozyma*, foram estudadas 8 cepas: ATCC 24202, ATCC 24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24261, NRRL Y-10921, NRRL-Y 10922 e NRRL-Y 17268, e 3 açúcares como fonte de carbono: glicose, sacarose e xilose. Os experimentos foram realizados com o meio de cultura YM ($3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura, $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de malte, $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peptona e $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ da fonte de carbono: glicose, sacarose ou xilose). Para a análise das concentrações de biomassa e astaxantina produzida por cada cepa em cada açúcar, foram realizados cultivos em agitador rotatório, utilizando erlenmeyers de 50mL contendo 20mL de meio de cultura, mantidos a 22°C , 300rpm, durante 7 dias. Nesse

estudo a máxima produção de biomassa ($9,6\text{g.L}^{-1}$) foi obtida com a cepa de *P. rhodozyma* NRRL Y-10922, utilizando xilose. A máxima produção de carotenóides ($3,6\text{mg.L}^{-1}$) foi observada na cepa *P. rhodozyma* NRRL Y-17268, com o mesmo açúcar. Para traçar o perfil dos carotenóides produzidos pelas cepas já citadas, foram realizados cultivos em fermentador de 2L, com 1L de volume útil, utilizando as mesmas formulações dos meios de cultivo em agitador rotatório. As condições desses processos fermentativos foram de 22°C , com a aeração em 6vvm e agitação de 600rpm. Os perfis dos carotenóides foram obtidos através de análises em HPLC, onde os resultados estão expostos na Tabela 3. Pode-se observar que o perfil mais complexo de carotenóides são os obtidos com a sacarose e o menos complexo os obtidos com glicose. Com isso, concluiu-se que o perfil de carotenóides depende tanto da cepa quanto da fonte de carbono e que o açúcar xilose, foi identificado como a fonte de açúcar que proporcionou a maior concentração volumétrica de astaxantina, atingindo cerca de 82% (VÁZQUEZ, SANTOS & PARAJÓ, 1997).

Tabela 3: Distribuição dos carotenóides (%) das cepas no meio de cultura contendo glicose, sacarose ou xilose.

Fonte de açúcar	Cepa	Ly	Ec	3-HE	HDC	Pho	Cx	C-Ax	T-Ax
Glicose	ATCC 24202	-	7	22	0	-	11	-	59
	ATCC 24203	-	3	10	8	-	6	-	73
	ATCC 24228	-	3	11	5	-	8	-	73
	ATCC 24229	-	0	0	0	-	0	-	100
	ATCC 24261	-	5	13	7	-	12	-	63
	NRRL-Y-10921	-	3	11	3	-	11	-	72
	NRRL-Y-10922	-	7	13	11	-	34	-	34
	NRRL-Y-17268	-	13	11	11	-	11	-	54
Sacarose	ATCC 24202	1	16	24	0	0	11	0	48
	ATCC 24203	3	6	10	3	3	8	6	60
	ATCC 24228	1	7	13	6	4	10	6	52
	ATCC 24229	8	21	29	0	0	0	0	42
	ATCC 24261	3	12	18	6	6	12	0	42
	NRRL-Y-10921	3	8	15	6	0	10	0	58
	NRRL-Y-10922	3	9	13	7	6	13	0	49
	NRRL-Y-17268	2	0	8	7	3	15	0	64
Xilose	ATCC 24202	0	0	5	11	-	2	0	78
	ATCC 24203	0	0	5	10	-	1	0	81
	ATCC 24228	0	0	4	9	-	1	0	83
	ATCC 24229	0	2	7	2	-	9	0	80
	ATCC 24261	0	1	4	11	-	3	0	79
	NRRL-Y-10921	0	0	2	4	-	2	8	85
	NRRL-Y-10922	0	0	6	10	-	2	0	82
	NRRL-Y-17268	1	1	4	9	-	3	4	78

Nomenclatura: Ly = Licopeno; Ec = Equinona; 3-HE = 3-hidroxi equinona; HDC = 4-hidroxi-3',4'-dideidro- β - ψ -caroteno; Pho = Fenicoxantina; Cx = Cantaxantina; C-Ax = cis-astaxantina; T-Ax = trans-astaxantina.

Fonte: VÁZQUEZ, SANTOS & PARAJÓ, 1997.

Como fonte de carbono, o glicerol foi utilizado para a produção de astaxantina com a levedura *Phaffia rhodozyma* PR190. Inicialmente foram realizados

cultivos para avaliar a influência do pH inicial do meio (4,5, 5,8 e 6,8) utilizando o meio composto de 10g.L^{-1} de extrato de levedura, 10g.L^{-1} de peptona e 27g.L^{-1} de glicerol, em agitador rotatório a 180rpm, 22°C durante 120h. Observou-se que o pH inicial 5,8 foi melhor para respostas crescimento celular ($16,5\text{g.L}^{-1}$) e produção de astaxantina volumétrica ($13,5\text{mg.L}^{-1}$). Entretanto com o pH 6,0, houve um melhor resultado tanto para biomassa ($18,27\text{g.L}^{-1}$) quanto na produção de astaxantina volumétrica ($28,9\text{mg.L}^{-1}$). Foi utilizado o mesmo meio de cultura citado na etapa anterior e as concentrações de glicerol variaram em 9,4, 18,7, 28,8 e $37,8\text{g.L}^{-1}$. Num reator de 2L contendo 1,5L de volume útil mantido a 22°C , com uma taxa de aeração de 0,67vvm, 300rpm, com 50% de oxigênio dissolvido. Os melhores resultados se apresentaram na concentração máxima de glicerol utilizada ($37,8\text{g.L}^{-1}$), onde a concentração de biomassa máxima atingida foi de $24,9\text{g.L}^{-1}$, a produção máxima de astaxantina específica foi $1,8\text{mg.g}^{-1}$ e volumétrica $33,7\text{mg.L}^{-1}$ em 168h (KUSDIYANTINI *et al.*, 1998).

A produção de astaxantina com a levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL-10921 e sua mutante *Phaffia rhodozyma* R1, foi estudada utilizando o leite de coco, como fonte de energia. Para esse estudo foram utilizados dois meios de cultivo para fins comparativos, o padrão utilizado para leveduras YM (10g.L^{-1} de glicose, 3g.L^{-1} de extrato de levedura, 5g.L^{-1} de peptona e 3g.L^{-1} de extrato de malte) e o leite de coco (16g.L^{-1} de carboidratos totais, $0,25\text{g.L}^{-1}$ de sódio, $0,1\text{g.L}^{-1}$ de magnésio, $2,94\text{g.L}^{-1}$ de potássio e 1g.L^{-1} de cloreto). As condições de produção foram de 22°C , 150rpm por 5 dias, realizadas em agitador rotatório com erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de meio de cultivo. Com a cepa selvagem, *P. rhodozyma* NRRL-10921, foram obtidos para o leite de coco e o meio padrão $9,2\text{g.L}^{-1}$ e $5,6\text{g.L}^{-1}$ de biomassa, $850\mu\text{g.g}^{-1}$ e $450\mu\text{g.g}^{-1}$ de astaxantina específica, respectivamente. Para a mutante *P. rhodozyma* R1, com o leite de coco e YM a biomassa foi $6,2\text{g.L}^{-1}$ e $4,8\text{g.L}^{-1}$ e a astaxantina específica $1.850\mu\text{g.g}^{-1}$ e $1.060\mu\text{g.g}^{-1}$. Concluiu-se que a síntese de astaxantina é parcialmente associada com o crescimento celular e essa produção ocorre mesmo após o término do crescimento e o esgotamento dos açúcares. E que a presença de vitaminas, aminoácidos e uma maior fonte de carbono no leite de coco são fatores responsáveis para o aumento da síntese de astaxantina pelas células da levedura *Phaffia rhodozyma* (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, PONCE-NOYOLA & TORRES-MUÑOZ, 2007).

Utilizando a metodologia seqüencial da aplicação de planejamentos experimentais, três tipos de planejamentos experimentais foram usados para otimizar

a produção de astaxantina através da cepa mutante de *Phaffia rhodozyma* 25-2 em culturas de frascos agitados. Primeiro foi realizado um planejamento experimental completo 2^5 , onde os fatores estudados foram: pH (4 e 6), temperatura (16 e 22°C), porcentagem do inóculo (5 e 10%), concentrações de carbono (6 e 9g.L⁻¹) e nitrogênio (0,5 e 1g.L⁻¹), cada um com dois níveis. Através do primeiro planejamento os fatores mais importantes foram determinados: concentração de carbono e temperatura. Baseado nesses resultados foi realizado um RSM aplicado em 2 fases. Na 1ª fase foi feita uma investigação da região experimental inicial para aumentar a resposta observada com as duas variáveis que tiveram efeito significativo em novas faixas de estudo: concentração de carbono (11 a 14g.L⁻¹) e temperatura (21 a 27°C). Na 2ª fase realizou-se uma ANOVA com os resultados obtidos e verificou-se um modelo quadrático que prevê bem os dados experimentais ($R^2=0,98$). Assim, construiu-se a superfície de resposta, chegando a condição ótima de produção de astaxantina: 11,25g.L⁻¹ de concentração de carbono e 19,7°C, pH inicial 6,0, 5% de inóculo e concentração de nitrogênio de 0,5g.L⁻¹. Sob essas condições a produção de astaxantina foi 8.100µg.L⁻¹ em 96h, aumentando em 92% em relação a produção das condições iniciais (RAMÍREZ, GUTIERREZ & GSCHAEDLER, 2001).

A produtividade e extratibilidade de astaxantina em uma cultura mista de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formalmente *Phaffia rhodozyma*) NCHU-FS501, um mutante super-produtor de astaxantina, e *Bacillus circulans* CCRC 11590 foram avaliados em um fermentador de 1,5L usando a técnica de cultivo em dois estágios. O primeiro estágio foi para o cultivo de *X. dendrorhous*. O segundo estágio foi o cultivo misturando a levedura e *B. circulans*. A atividade da enzima lítica do *B. circulans* foi aumentada em 24h com o nitrogênio base (YNB) como fonte de nitrogênio e incubado a 30°C na cultura pura. A indução da atividade da enzima lítica do *B. circulans* foi influenciada pela concentração da parede celular da *X. dendrorhous*. O tempo de cultivo no primeiro estágio do cultivo afetou significativamente a extratibilidade do carotenóide no segundo estágio do processo. A extratibilidade mínima foi encontrada quando *X. dendrorhous* foi cultivado por 96h no primeiro estágio. A concentração de glicose de 45g.L⁻¹ em YNB sustentou um aumento no crescimento de *X. dendrorhous* e produção de astaxantina, com a produção de astaxantina volumétrica de 9.010µg.L⁻¹ foi observado durante o primeiro estágio. Contudo a levedura produziu mais astaxantina com peptona como base de nitrogênio durante o primeiro estágio, YNB suportou um aumento na extratibilidade do carotenóide e atividade lítica do *B. circulans* no segundo estágio de cultivo. O pH e temperatura ótima para a extração do

pigmento na cultura mista foi 6,5 e 30-34°C, respectivamente. Sob essas condições, aproximadamente 97% do pigmento total pode ser extraído após 48h do tempo de incubação. Quando a enzima crua foi reciclada na cultura mista, a atividade da enzima lítica de 20U.mL⁻¹ foi obtida após um ciclo de incubação (48h), com 69% do total de carotenóides extraídos (FANG & WANG, 2002).

2.8. Efluente da parboilização do arroz

O setor agropecuário do Rio Grande do Sul é destaque nacional, com participação de 13,42% no total da produção brasileira. O cultivo do arroz no estado abrange cerca de 47,8% do total produzido no Brasil, tornando o Rio Grande do Sul um dos maiores produtores nacionais deste grão, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. A atividade do plantio e a indústria do beneficiamento do arroz constituem uma das principais atividades econômicas na metade sul do Rio Grande do Sul, correspondendo a 99,8% da produção do estado, gerando metade de toda a produção nacional, com arrozais irrigados ocupando a faixa litorânea compreendida entre os municípios de Rio Grande e Santa Vitória do Palmar.

O arroz parboilizado representa 25% do total de arroz produzido no Brasil, assim como no resto do mundo, sendo a parboilização do arroz definida na legislação brasileira como o processo hidrotérmico, no qual o arroz em casca é imerso em água potável com temperatura acima de 58°C, seguido de uma gelatinização parcial ou total do amido e secagem (BRASIL, 1988; AMATO & SILVEIRA, 1991).

O processo de parboilização utiliza 1,12L de água e gera 0,83L de efluente por kg de arroz em casca, que contém altas cargas de substâncias orgânicas e nutrientes (FARIA, 2006). Este processo envolve significativo volume de efluente, cujos nutrientes, em especial o nitrogênio por ele carregado, poderiam ser aproveitados (QUEIROZ & KOETZ, 1997).

A caracterização físico-química aproximada de um efluente oriundo do processo de parboilização de arroz é apresentada na Tabela 4:

Tabela 4: Caracterização físico-química do efluente da parboilização de arroz.

Parâmetros (mg.L⁻¹)	Mínimo	Média	Máximo
Alcalinidade 4.30	105,0	616,0	1.351,0
Alcalinidade 5.75	408,0	573,0	690,0
Ácidos Voláteis Totais	120,0	672,0	1.357,0
Cloretos	16,0	162,7	307,0
Demanda Bioquímica de oxigênio (DBO)	1.600,0	3.200,0	4.580,0
Demanda Química de oxigênio (DQO) total	1.898,0	4.536,0	7.809,0
DQO solúvel	1.668,0	4.029,0	7.266,0
Fósforo	340,0	100,0	143,4
Nitrogênio Amoniacal	9,6	35,0	74,4
Nitrogênio Total Kjeldahl	48,0	91,0	141,0
pH	3,4	5,8	7,6
Sólidos Suspensos Totais	118,0	294,0	492,0
Sólidos Suspensos Voláteis	94,0	249,0	428,0
Sulfetos	5,8	95,0	354,8
Sulfatos	51,0	141,0	202,0

Fonte: FARIA, 2006.

2.9. Considerações gerais

De acordo com a revisão bibliográfica apresentada não foram encontradas pesquisas que realizem o aproveitamento da água de parboilização do arroz, como substrato para o meio de cultivo na bioprodução de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. Além deste aspecto, poucos trabalhos enfocam o estudo de fontes alternativas de nutrientes, como o efluente de parboilização e a estratégia de planejamento experimental, que visa realizar um menor número de experimentos quando comparado as técnicas convencionais de otimização, alcançando mais rapidamente a minimização de custos e maximização de rendimento do processo.

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais e a metodologia analítica usadas para o desenvolvimento do estudo da bioprodução de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*.

3.1. Seleção do microrganismo

Foram utilizadas 3 cepas de *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-10921, NRRL Y-10922 e NRRL Y-17268, gentilmente cedidas pela *Agricultural Research Service Culture Collection*, vinculada ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, para a seleção da cepa mais promissora quanto a produção do carotenóide astaxantina.

Os microrganismos, inicialmente liofilizados, foram reativados em caldo YM (3g.L^{-1} de extrato de levedura, 3g.L^{-1} de extrato de malte, 5g.L^{-1} de peptona e 10g.L^{-1} de glicose) e mantidos a 4°C em tubos de ensaio contendo meio ágar inclinado YM (mesmos componentes citados anteriormente, adicionados de 30g.L^{-1} de ágar), segundo instruções fornecidas.

Para evitar repiques sucessivos e a possibilidade de mutação celular, foi feito para cada cepa uma suspensão dos microrganismos cultivados em ágar inclinado, usando 2mL de água peptonada (0,1%). Essa suspensão foi passada para 10mL de caldo YM, e incubada à 25°C por 48h. Após, foi realizado um cultivo submerso, utilizando os 10mL da cultura em 90mL de caldo YM em erlenmeyer de 500mL, nas mesmas condições citadas anteriormente a 150rpm. Deste meio cultivado foram retirados 5mL e adicionados em tubos contendo 5mL de glicerol (20%), previamente esterilizados sendo acondicionados a -18°C .

3.1.1. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos erlenmeyers de 500mL contendo 90mL do caldo YM (3g.L^{-1} de extrato de levedura, 3g.L^{-1} de extrato de malte, 5g.L^{-1} de peptona, 10g.L^{-1} de glicose), adicionados de $0,2\text{g.L}^{-1}$ de KNO_3 (PARAJÓ, SANTOS & VÁZQUEZ, 1998), sendo previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, e adicionado 10mL de cultivo contido no tubo de glicerol previamente descongelado. O inóculo foi incubado a 150rpm, 25°C por 48h, tempo necessário para

concentração celular atingir 1×10^8 células.mL⁻¹, contadas através de câmara de Neubauer (ZHANG *et al.*, 2005).

3.1.2. Bioprodução de carotenóides para seleção da cepa de *Phaffia rhodozyma*

Para selecionar a melhor cepa produtora de astaxantina foram realizados cultivos em duplicatas em frascos erlenmeyers de 500mL com 153mL do meio de cultivo. Foram testados dois meios de cultivo, o meio YM (3g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3g.L⁻¹ de extrato de malte, 5g.L⁻¹ de peptona e 10g.L⁻¹ de glicose) e um segundo meio de cultivo contendo: 3g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3g.L⁻¹ de extrato de malte, 5g.L⁻¹ de peptona e 20g.L⁻¹ de sacarose (VÁZQUEZ, SANTOS & PARAJÓ, 1997), que diferiram apenas na substituição da fonte de açúcar. Os meios de bioprodução foram acrescidos de 10% de inóculo (17mL), contendo 1×10^8 células (ZHANG *et al.*, 2005). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 e as condições operacionais foram 25°C, 150rpm por 168h.

Amostras foram coletadas a cada 24h, acompanhando a biomassa, o pH e a concentração de astaxantina, segundo as metodologias descritas nos itens 3.3.1, 3.3.3 e 3.3.4, respectivamente.

3.2. Maximização da bioprodução de astaxantina a partir da *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268

Na seqüência dos experimentos, visando a maximização da bioprodução do carotenóide astaxantina, foi utilizada a cepa da levedura *P. rhodozyma* NRRL-Y 17268.

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental fracionário 2_V^{6-2} (16 ensaios e 4 pontos centrais), com a finalidade de avaliar o efeito da concentração dos componentes do meio de cultivo: extrato de levedura, extrato de malte, peptona, sacarose, efluente da parboilização do arroz e o pH inicial do meio, como mostra a Tabela 5, tendo como resposta os máximos de biomassa, produção de astaxantina volumétrica e produção de astaxantina específica.

Tabela 5: Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{6-2} com valores reais e codificados.

Ensaio	Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	Extrato de Malte (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	Sacarose (g.L ⁻¹)	Efluente (g.L ⁻¹)	pH
1	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	4 (-1)
2	10 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	5 (-1)	180 (+1)	4 (-1)
3	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	5 (-1)	180 (+1)	6 (+1)
4	10 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	6 (+1)
5	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	5 (-1)	180 (+1)	6 (+1)
6	10 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	5 (-1)	0 (-1)	6 (+1)
7	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	5 (-1)	0 (-1)	4 (-1)
8	10 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	5 (-1)	180 (+1)	4 (-1)
9	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	20 (+1)	0 (-1)	6 (+1)
10	10 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	20 (+1)	180 (+1)	6 (+1)
11	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	20 (+1)	180 (+1)	4 (-1)
12	10 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	20 (+1)	0 (-1)	4 (-1)
13	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	20 (+1)	180 (+1)	4 (-1)
14	10 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	20 (+1)	0 (-1)	4 (-1)
15	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	20 (+1)	0 (-1)	6 (+1)
16	10 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	20 (+1)	180 (+1)	6 (+1)
17	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)
18	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)
19	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)
20	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)

Após a realização do primeiro planejamento experimental foi feito um testes de diferenças de média, Teste de Tukey ($p < 0,05$), para avaliação da concentração do extrato de levedura como componente do meio de produção. Foram realizados cultivos em triplicatas, utilizando a metodologia de inóculo descrita no item 3.1.1. O meio de produção utilizado foi escolhido a partir dos resultados do planejamento fracionário e teve a seguinte composição: 5g.L⁻¹ de extrato de malte, 5g.L⁻¹ de peptona, 10g.L⁻¹ de sacarose, 90g.L⁻¹ de efluente, pH inicial do meio 5,0 e o extrato de levedura variando em 3 concentrações de 0, 0,5 e 1g.L⁻¹, a 25°C, 150rpm, durante 168h.

Com base nos resultados anteriores, as variáveis significativas na bioprodução de astaxantina foram escolhidas e as faixas de estudo redefinidas, realizando um planejamento experimental 2^4 (16 ensaios e 3 pontos centrais). As variáveis: concentração de extrato de malte, concentração de peptona, concentração de sacarose e concentração de efluente (Tabela 6) foram estudadas, sendo o pH inicial mantido em 5,0, a 25°C, 150rpm, por 168h. Foram avaliadas as respostas máximas da produção de biomassa, produção de astaxantina específica e produção de astaxantina volumétrica.

Tabela 6: Matriz do planejamento experimental fracionário 2⁴ com valores reais e codificados.

Ensaio	Extrato de Malte (g.L⁻¹)	Peptona (g.L⁻¹)	Sacarose (g.L⁻¹)	Efluente (g.L⁻¹)
1	8,75 (-1)	8,75 (-1)	15 (-1)	87,5 (-1)
2	16,25 (+1)	8,75 (-1)	15 (-1)	87,5 (-1)
3	8,75 (-1)	16,25 (+1)	15 (-1)	87,5 (-1)
4	16,25 (+1)	16,25 (+1)	15 (-1)	87,5 (-1)
5	8,75 (-1)	8,75 (-1)	35 (+1)	87,5 (-1)
6	16,25 (+1)	8,75 (-1)	35 (+1)	87,5 (-1)
7	8,75 (-1)	16,25 (+1)	35 (+1)	87,5 (-1)
8	16,25 (+1)	16,25 (+1)	35 (+1)	87,5 (-1)
9	8,75 (-1)	8,75 (-1)	15 (-1)	162,5 (+1)
10	16,25 (+1)	8,75 (-1)	15 (-1)	162,5 (+1)
11	8,75 (-1)	16,25 (+1)	15 (-1)	162,5 (+1)
12	16,25 (+1)	16,25 (+1)	15 (-1)	162,5 (+1)
13	8,75 (-1)	8,75 (-1)	35 (+1)	162,5 (+1)
14	16,25 (+1)	8,75 (-1)	35 (+1)	162,5 (+1)
15	8,75 (-1)	16,25 (+1)	35 (+1)	162,5 (+1)
16	16,25 (+1)	16,25 (+1)	35 (+1)	162,5 (+1)
17	12,5 (0)	12,5 (0)	25 (0)	125 (0)
18	12,5 (0)	12,5 (0)	25 (0)	125 (0)
19	12,5 (0)	12,5 (0)	25 (0)	125 (0)
20	12,5 (0)	12,5 (0)	25 (0)	125 (0)

As amostras foram coletadas em tempos de amostragem pré-determinados para o acompanhamento da concentração de biomassa, pH e concentração de astaxantina, segundo metodologias descritas nos itens 3.3.1, 3.3.3 e 3.3.4. No segundo planejamento experimental foi feito o acompanhamento da concentração de sacarose inicial e final, segundo a metodologia descrita no item 3.3.2. As análises dos dados foram realizadas utilizando o programa STATISTICA V. 6.0 (Statsoft).

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Determinação da concentração de biomassa

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

3.3.2. Determinação da concentração de sacarose

A concentração de sacarose medida como açúcares não-redutores foi determinada através do método DNS adaptado (GARDA-BUFFON, 2002).

3.3.3. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um pHmetro segundo AOAC (1995).

3.3.4. Determinação da concentração de astaxantina

Para a determinação da concentração de astaxantina foi feita autólise de 0,05g de células secas (48h a 35°C) e congeladas (48h à -18°C) com 2mL de dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizadas em vórtex e deixando a reação ocorrer por 30 minutos. Após a ruptura foi adicionado 6mL de acetona para facilitar a extração do carotenóide. A amostra foi centrifugada a 1800g por 10 minutos, 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 10mL 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. A determinação da concentração de astaxantina foi feita em espectrofotômetro a 474nm (BONFIM, 1999). O cálculo para a concentração de astaxantina específica foi feito através da Equação 1, utilizando o coeficiente de absorvidade específica 1600 para xantofilas (LIU, WU & HO, 2006).

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

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

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

Para o cálculo da astaxantina volumétrica foi realizada uma conversão de unidades utilizando o resultado da astaxantina específica ($\mu\text{g.g}^{-1}$) e da concentração da biomassa (mg.mL^{-1}).

3.4. Caracterização parcial do efluente

3.4.1. Determinação da concentração de carbono e hidrogênio

As análises de carbono e hidrogênio no efluente de parboilização do arroz foram realizadas com o Analisador Elementar CHNS/O, Modelo 2400 da Perkin Elmer. Para a calibração do equipamento foi utilizado o material de referência certificado acetanilida, o qual verificou o controle de qualidade das análises. O percentual de recuperação das 2 amostras de acetanilidas foi de 100,63% para C e 106,9% para H.

3.4.2. Determinação da concentração de nitrogênio

A análise de nitrogênio no efluente de parboilização do arroz foi realizado utilizando a metodologia oficial para determinação de nitrogênio total, Método Kjeldahl, de acordo com a AOAC (1995).

3.4.3. Determinação da concentração de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados através do método de DNS adaptado (GARDA-BUFFON, 2002).

3.4.4. Determinação da concentração de fósforo

A determinação da quantidade de fósforo foi realizada através da AOAC (2000) nº 973.55.

3.4.5. Determinação da concentração de sólidos solúveis totais

A determinação da quantidade de sólidos solúveis totais foi realizada através da AOAC (2000) nº 920.193.

3.4.6. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

A determinação da demanda química de oxigênio (DQO) foi avaliada conforme indicado em Standard Methods (1995), que tem como base a oxidação da matéria orgânica por ebulição em presença do ácido sulfúrico. A amostra é fervida a refluxo, com dicromato de potássio e o ácido sulfúrico, o excesso de dicromato é titulado com sulfato ferroso amoniacal em presença de ferroína. A quantidade de matéria orgânica é proporcional ao dicromato de potássio consumido e é medida como oxigênio equivalente.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussões relativas aos experimentos realizados para bioprodução de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*.

4.1. Seleção do microrganismo

Foram empregadas 3 cepas da levedura *Phaffia rhodozyma*: NRRL Y-17268, NRRL Y-10921 e NRRL Y-10922, para a escolha do microrganismo a ser utilizado na maximização da bioprodução de astaxantina.

A Figura 6 apresenta a média dos cultivos realizados em duplicata mostrando o acompanhamento da bioprodução de astaxantina volumétrica e específica, da produção de biomassa e a variação do pH, ao longo de 168h de cultivo, usando glicose como fonte de açúcar.

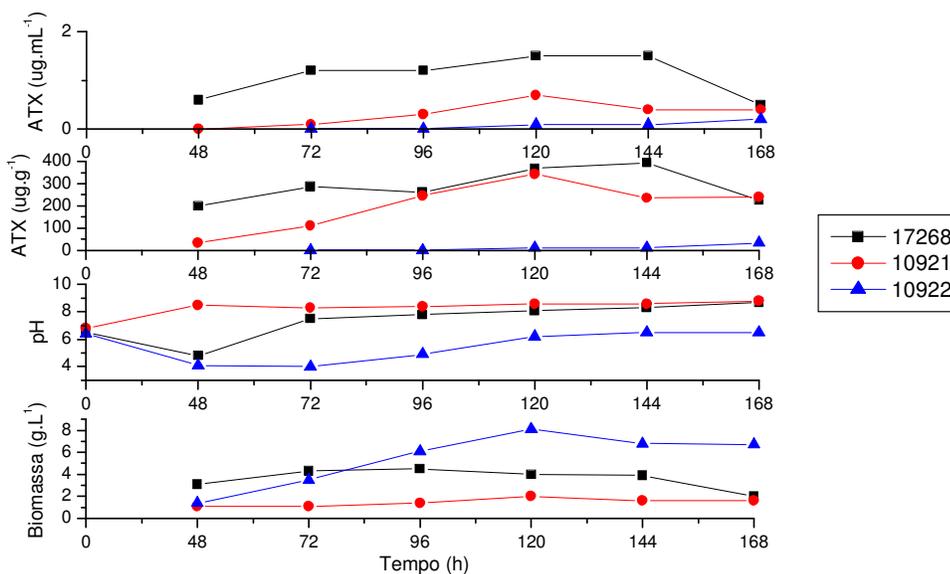


Figura 6: Média do acompanhamento da produção de biomassa, pH, astaxantina específica e volumétrica ao longo do cultivo para as cepas estudadas utilizando glicose.

ATX = astaxantina.

Em relação ao pH (Figura 6), a cepa NRRL Y-17268 apresenta o comportamento característico da levedura. Inicialmente ocorre uma queda do pH até as 48h de cultivo (4,8) e nas 24h subsequentes ocorre um aumento (7,5), mantendo-

se em ascensão constante até o término do processo. A cepa NRRL Y-10922 apresenta comportamento semelhante, porém o decréscimo do pH se prolonga até as 72h (4,0) e a elevação até as 144h (6,5), sendo constante até 168h de cultivo.

Essa característica de mudança no pH, é provavelmente devido ao fato da levedura *Phaffia rhodozyma* excretar um intermediário carbônico durante o crescimento, por exemplo o ácido acético, um álcool ou um 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 processo fermentativo (BONFIM, 1999; ZENI, 2009). No cultivo de uma cepa de *Phaffia rhodozyma* mutante (2A2N), verifica-se o mesmo comportamento do pH, apresentando uma queda até o tempo de 40h, passando a elevar-se nas próximas horas do processo (AN, JANG & CHO, 2001).

Quanto a cepa NRRL Y-10921 (Figura 6), provavelmente houve alguma condição inadequada ao microrganismo, como a temperatura, que resultou em um comportamento diferenciado. O pH dessa cepa teve um aumento nas primeiras 24h (8,5) e manteve-se constante até o final do período de cultivo. Provavelmente devido a este fato, essa cepa apresentou o menor crescimento celular, atingindo o máximo de $2,0\text{g.L}^{-1}$. Porém, a bioprodução de astaxantina alcançou valores de $344,3\mu\text{g.g}^{-1}$, mostrando que essa levedura pode ter seguido uma outra via metabólica e ainda assim produzido astaxantina, principalmente devido a esse microrganismo produzir o carotenóide como forma de proteção, em condições de estresse celular (BONFIM, 1999). Por essa cepa ter apresentado um menor crescimento celular e uma boa produção de astaxantina específica, a produção de astaxantina volumétrica (relação da biomassa com astaxantina específica) alcançou o máximo de $0,7\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Na Figura 6 nota-se que apesar da biomassa máxima ($8,1\text{g.L}^{-1}$) ter sido alcançada pela cepa NRRL Y-10922, foi também a cepa com a menor produção específica de astaxantina ($34,5\mu\text{g.g}^{-1}$), resultando na menor produção de astaxantina volumétrica ($0,2\mu\text{g.mL}^{-1}$). A cepa com a maior produção de astaxantina volumétrica ($1,5\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi a NRRL Y-17268, que apresentou um crescimento celular máximo de $4,5\text{g.L}^{-1}$ e a maior produção de astaxantina específica ($394,4\mu\text{g.g}^{-1}$).

A Figura 7 mostra a média do acompanhamento da bioprodução de astaxantina volumétrica e específica, da produção de biomassa e a variação do pH, ao longo de 168h de cultivo, usando sacarose como fonte de açúcar.

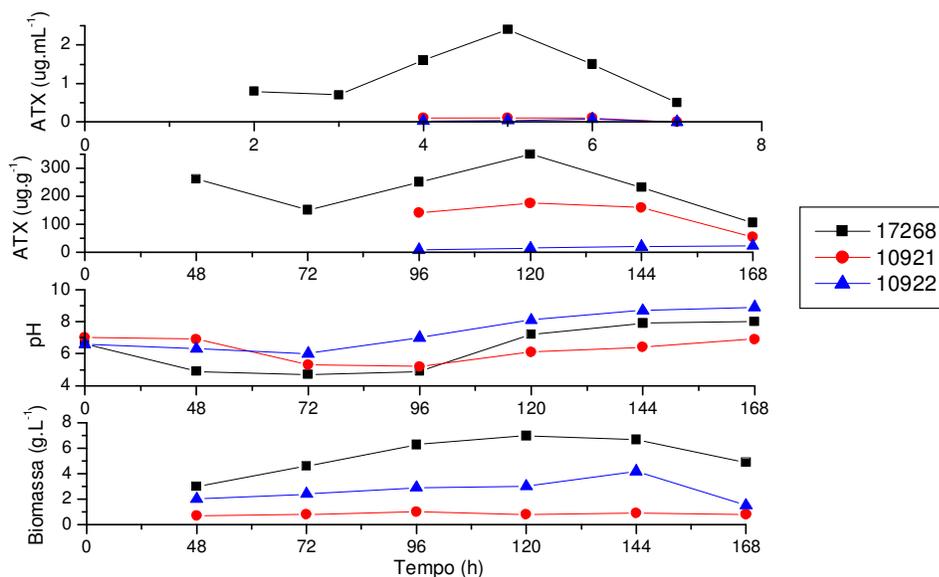


Figura 7: Média do acompanhamento da produção de biomassa, pH, astaxantina específica e volumétrica ao longo do cultivo para as cepas estudadas utilizando sacarose.

ATX= astaxantina.

Na Figura 7 pode-se notar que o comportamento do pH para as 3 cepas estudadas é semelhante. Todas têm uma queda inicial no pH e em seguida, elevam o pH até o término do cultivo. Fazendo uma comparação do pH em relação a Figura 6 (meio de cultivo contendo glicose), nota-se que na Figura 7 o pH tem uma queda mais prolongada, o que pode ser atribuído ao fato da levedura partindo do mesmo inóculo (meio padrão YM, contendo glicose), ter uma fase *lag* menor com o meio padrão, enquanto que no meio de cultivo contendo sacarose esta fase pode ter se prolongado até que o microrganismo se adapte ao meio.

O crescimento celular (Figura 7) alcançado para a cepa NRRL Y-17268 e NRRL Y-10922, atingiu a valores máximos de $7,0\text{g.L}^{-1}$ e $4,2\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A cepa NRRL Y-10921 apresentou um pequeno crescimento permanecendo praticamente constante, chegando no máximo a $1,0\text{g.L}^{-1}$. A astaxantina específica e astaxantina volumétrica tiveram o mesmo comportamento observado da Figura 7. A cepa NRRL Y-17268 foi a maior produtora de astaxantina, alcançando o máximo de $350,2\mu\text{g.g}^{-1}$, seguido da cepa NRRL Y-10921 com $175,1\mu\text{g.g}^{-1}$ e da cepa NRRL Y-10922 que novamente foi o microrganismo que apresentou a menor produção,

21,8 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Relacionando as duas respostas obtidas anteriormente, tem-se a astaxantina volumétrica que alcançou o máximo de 2,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a cepa NRRL Y-17268 e 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tanto para a cepa NRRL Y-10921 quanto para a cepa NRRL Y-10922.

A Tabela 7 apresenta a média dos resultados máximos obtidos quanto a biomassa e a bioprodução de astaxantina para as 3 cepas, utilizando glicose e sacarose.

Tabela 7: Resultados máximos obtidos para biomassa e bioprodução de astaxantina para as 3 cepas estudadas, utilizando glicose e sacarose.

Cepas	Biomassa (g.L^{-1})		Astaxantina específica ($\mu\text{g.g}^{-1}$)		Astaxantina volumétrica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	Glicose	Sacarose	Glicose	Sacarose	Glicose	Sacarose
17268	4,5	7,0	394,4	350,2	1,5	2,4
10921	2,0	1,0	344,3	175,1	0,7	0,1
10922	8,1	4,2	34,5	21,8	0,2	0,1

Através da Tabela 7 observa-se que em relação a biomassa e a produção de astaxantina específica, os melhores resultados são utilizando a glicose como fonte de açúcar de 8,1 g.L^{-1} (10922) e 394,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (17268), respectivamente. Porém, para a astaxantina volumétrica o máximo alcançado foi 2,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (17268) usando a sacarose.

Uma vez que o grande interesse é obter uma alta produção de astaxantina em uma elevada concentração celular, o microrganismo selecionado para o estudo do seqüenciamento deste trabalho foi a cepa *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268, que apresentou os valores máximos observados na Tabela 7, com exceção da concentração celular em glicose. A escolha da sacarose como fonte de carbono, foi devido a este açúcar ter apresentado a maior produção de astaxantina volumétrica, além desta fonte de carbono possibilitar estudos futuros de co-produtos industriais ricos em sacarose.

As cepas estudadas nesse trabalho também foram investigadas para produção de carotenóides totais por Vázquez, Santos & Parajó (1997). As 8 cepas de *Phaffia rhodozyma*: ATCC 24202, ATCC 24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24261, NRRL Y-10921, NRRL-Y 10922 e NRRL-Y 17268 foram estudadas, utilizando 3 fontes de carbono distintas: glicose, sacarose e xilose. As cepas NRRL Y-17268,

NRRL Y-10922 e NRRL Y-10921, alcançaram utilizando glicose, respectivamente, a concentração de biomassa e de carotenóides totais de $5,4\text{g.L}^{-1}$, $5,6\text{g.L}^{-1}$, $5,7\text{g.L}^{-1}$ e $1,59\text{mg.L}^{-1}$, $0,82\text{mg.L}^{-1}$, $0,64\text{mg.L}^{-1}$. Utilizando a sacarose, as mesmas cepas apresentaram a biomassa e carotenóides totais de $6,2\text{g.L}^{-1}$, $6,3\text{g.L}^{-1}$, $5,9\text{g.L}^{-1}$ e $0,31\text{mg.L}^{-1}$, $0,32\text{mg.L}^{-1}$, $0,30\text{mg.L}^{-1}$, na mesma sequência citada anteriormente. Nesse estudo a cepa escolhida foi a NRRL Y-17268 cultivada em xilose, com uma concentração de carotenóides totais volumétrica máxima de $3,60\text{mg.L}^{-1}$.

Em virtude das condições distintas de temperatura, agitação e provavelmente aeração no meio, pode-se observar valores superiores da bioprodução de astaxantina aos obtidos com a cepa NRRL Y-17268 nesse trabalho.

Na Figura 6 e 7, verifica-se que na produção de astaxantina específica ocorrem pequenas oscilações durante a produção, principalmente na cepa NRRL Y-17268 utilizando sacarose como fonte de açúcar. Aliando esse fato ao estudo que apresenta o perfil dos carotenóides produzidos pelas leveduras com 3 tipos de açúcares (glicose, sacarose e xilose), onde o mais complexo é o obtido pela sacarose (VÁZQUEZ, SANTOS & PARAJÓ, 1997), sugere-se que essa variabilidade possa ser o motivo das oscilações ocorridas nos gráficos de produção. Pois para quantificação de astaxantina é necessário um comprimento de onda específico e a partir do momento que outros carotenóides possam estar presentes, podem interferir na determinação.

Assim, foi realizada uma varredura em espectrofotômetro no comprimento de onda variando entre 350 a 800nm e a absorbância entre 0 a 0,8 (Figura 8). Essa varredura foi feita com uma amostra obtida do cultivo utilizando sacarose e a cepa de *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268.

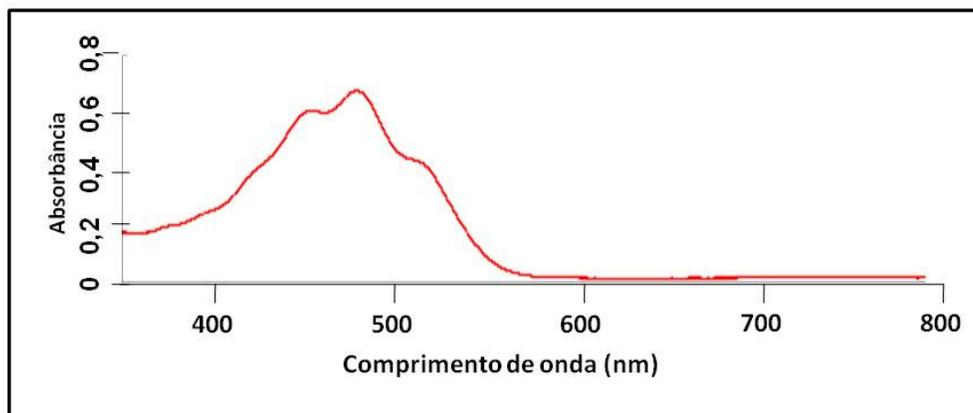


Figura 8: Varredura em espectrofotômetro (*Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268 em meio contendo sacarose).

Segundo Davies (1976), através da Figura 8 pode-se verificar 3 picos de absorvância, onde o 1º pico tem o valor aproximado de 452nm, podendo representar a presença do β -caroteno. O 2º pico é de aproximadamente 480nm, característico da astaxantina, sendo responsável pela maior absorção no éter de petróleo. E o 3º pico tem o valor aproximado a 516nm, sugerindo a presença de equinona, em menor quantidade na amostra analisada.

Esses mesmos carotenóides já foram identificados em análises da composição dos carotenóides produzidos pela levedura *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202, tendo o β -caroteno representado 11,7%, a equinona 5,7% e a astaxantina 62,7% da produção (FONTANA *et al.*, 1996). Na cepa de *Phaffia rhodozyma* 67-385 também foram verificados os percentuais desses mesmos carotenóides como 52% de astaxantina, 6,7% de β -caroteno e 1,1% de equinona (AN, CHO & JOHNSON, 1999).

4.2. Caracterização parcial do Efluente

Com o interesse em usar o efluente de parboilização do arroz como substrato nos meios de cultivo a serem estudados nesse trabalho, foi feita a caracterização parcial do efluente centrifugado, para remoção de interferentes do processo de cultivo da levedura, apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Caracterização parcial do efluente de parboilização do arroz centrifugado.

Parâmetros	Resultados
Carbono total	0,18%
Nitrogênio total	15,19mg.L ⁻¹
Hidrogênio total	3,11%
Fósforo	30,7mg.L ⁻¹
Sólidos solúveis totais (SST)	3,97g.L ⁻¹
Açúcares totais	67mg.L ⁻¹
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	3.144,53mg.L ⁻¹
pH	5,0

A Tabela 8 apresenta a porcentagem de hidrogênio e carbono: 3,11% e 0,18%, respectivamente. E o valor de açúcares totais foi 67mg.L⁻¹ e de sólidos solúveis totais (SST) de 3,97g.L⁻¹.

O pH observado foi 5,0, estando próximo ao valor médio encontrado em estudo de caracterização do efluente: 5,8 (FARIA *et al.*, 2006). Queiroz & Koetz (1997), justificam a variação do pH na faixa de 4,02 e 5,80 devido ao tempo de maceração no processo de parboilização, quanto maior o tempo menor será o pH.

Em relação ao nitrogênio total o valor encontrado foi de 15,19mg.L⁻¹, superior ao encontrado por Queiroz & Koetz (1997), que realizando a caracterização do efluente de parboilização do arroz encontraram o valor médio de nitrogênio total de 9,64mg.L⁻¹. Portanto, a quantidade de nitrogênio total desse trabalho está acima da média observada. Uma observação feita no mesmo trabalho citado anteriormente é que o efluente é uma excelente fonte de nitrogênio orgânico, passível a ser incorporado na biomassa dos microrganismos. Essa incorporação pode levar o nitrogênio fazer parte da rota metabólica dos mesmos, contribuindo para a produção de seus metabólitos.

Quanto ao fósforo, verifica-se que o resultado obtido foi de 30,7mg.L⁻¹. No mesmo trabalho citado anteriormente (QUEIROZ & KOETZ, 1997), a quantidade mínima de fósforo foi 11,75mg.L⁻¹, sendo novamente inferior ao valor encontrado nesse estudo. Outro trabalho apresenta a caracterização do efluente de parboilização do arroz e tem o fósforo em quantidade mínima de 34,0mg.L⁻¹ (FARIA *et al.* 2006), valor muito próximo ao verificado nesse estudo.

A demanda química de oxigênio (DQO) apresentada na foi 3.144,53mg.L⁻¹. Esse valor de DQO é superior ao valor médio (1.742,8mg.L⁻¹) de Queiroz & Koetz

(1997) e ao valor mínimo ($1.898,0\text{mg.L}^{-1}$) de Faria *et al.* (2006). O alto valor de DQO é considerado preocupante quando esse efluente é lançado em riachos, pois indica uma alta quantidade de partículas solúveis que serão utilizadas por microrganismos, podendo ocasionar o impacto ambiental conhecido como eutrofização.

Dessa forma, o efluente de parboilização do arroz avaliado está de acordo com os valores obtidos na literatura, possibilitando seu uso no meio de cultivo como fonte de nitrogênio.

4.3. Maximização da bioprodução de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268

4.3.1. Planejamento fracionário 2_V^{6-2}

Nesta primeira etapa foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito das concentrações dos componentes do meio de bioprodução de astaxantina, que foram: concentração de extrato de levedura, extrato de malte, peptona, sacarose, água de parboilização do arroz e o pH inicial do meio. As três respostas avaliadas foram os máximos valores alcançados na produção de biomassa, produção de astaxantina específica e produção de astaxantina volumétrica.

A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis em estudo, bem como suas respostas.

Tabela 9: Matriz do planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{6-2} com valores reais e codificados, concentração máxima de biomassa, produção máxima de astaxantina específica e produção máxima de astaxantina volumétrica.

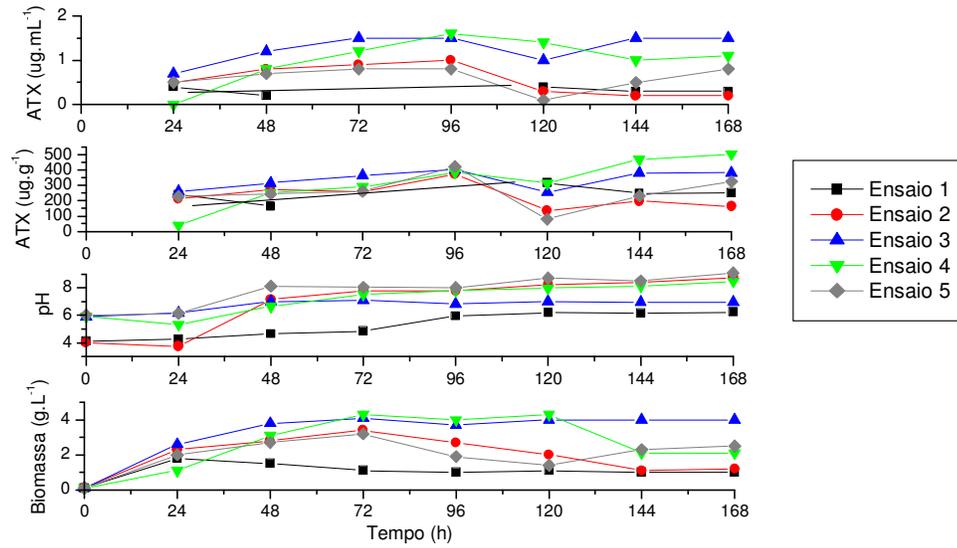
Ensaio	Extrato de Levedura (g.L ⁻¹) ¹⁾	Extrato de Malte (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	Sacarose (g.L ⁻¹)	Efluente (g.L ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Astaxantina específica (µg.g ⁻¹)	Astaxantina volumétrica (µg.mL ⁻¹)
1	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	4 (-1)	1,8	317,5	0,4
2	10 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	5 (-1)	180 (+1)	4 (-1)	3,4	375,0	1,0
3	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	5 (-1)	180 (+1)	6 (+1)	4,1	402,7	1,5
4	10 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	5 (-1)	0 (-1)	6 (+1)	4,3	505,3	1,6
5	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	5 (-1)	180 (+1)	6 (+1)	3,2	423,9	0,8
6	10 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	5 (-1)	0 (-1)	6 (+1)	2,3	538,4	1,3
7	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	5 (-1)	0 (-1)	4 (-1)	4,7	482,7	1,8
8	10 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	5 (-1)	180 (+1)	4 (-1)	4,5	378,6	1,7
9	1 (-1)	1 (-1)	1 (-1)	20 (+1)	0 (-1)	6 (+1)	3,2	370,0	0,9
10	10 (+1)	1 (-1)	1 (-1)	20 (+1)	180 (+1)	6 (+1)	6,8	323,0	1,8
11	1 (-1)	10 (+1)	1 (-1)	20 (+1)	180 (+1)	4 (-1)	7,6	348,1	2,5
12	10 (+1)	10 (+1)	1 (-1)	20 (+1)	0 (-1)	4 (-1)	7,1	364,3	2,6
13	1 (-1)	1 (-1)	10 (+1)	20 (+1)	180 (+1)	4 (-1)	7,1	350,8	2,1
14	10 (+1)	1 (-1)	10 (+1)	20 (+1)	0 (-1)	4 (-1)	5,6	410,4	2,3
15	1 (-1)	10 (+1)	10 (+1)	20 (+1)	0 (-1)	6 (+1)	8,9	379,5	3,1
16	10 (+1)	10 (+1)	10 (+1)	20 (+1)	180 (+1)	6 (+1)	8,9	307,1	1,4
17	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)	5,3	399,9	1,8
18	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)	4,6	396,8	1,8
19	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)	5,4	435,5	2,0
20	5,5 (0)	5,5 (0)	5,5 (0)	12,5 (0)	90 (0)	5 (0)	4,5	448,9	1,7

Através da Tabela 9 nota-se que o máximo para as diferentes respostas foram alcançados em ensaios distintos. O crescimento celular variou de 1,8 (ensaio 1) a 8,9g.L⁻¹ (ensaio 15 e 16), a produção de astaxantina específica variou de 307,1 (ensaio 16) a 538,4μg.g⁻¹ (ensaio 6) e a produção de astaxantina volumétrica de 0,4 (ensaio 1) a 3,1μg.mL⁻¹ (ensaio 15). Observa-se também que em geral, os máximos valores de biomassa encontrados estão no nível +1 de sacarose e os máximos de produção específica de astaxantina se encontram no nível -1 dessa mesma variável, indicando a concentração dessa variável é um dos componentes mais influentes do meio de composição em estudo.

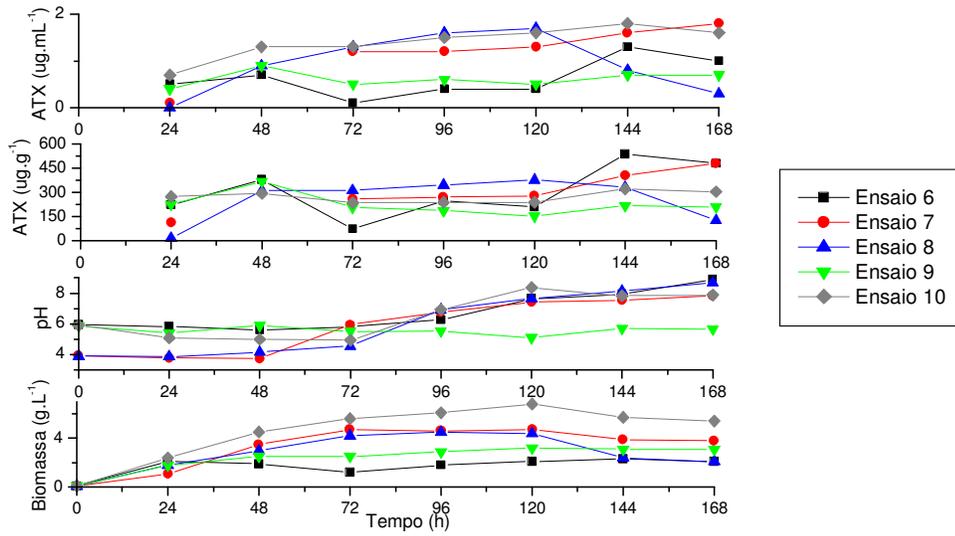
A literatura relata que a influência de diferentes fatores de cultivo na síntese de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* tem sido alvo de muitos estudos. Entretanto, várias questões sobre o mecanismo de regulação da síntese dos carotenóides, incluindo astaxantina, ainda não estão claros. Nota-se que existem diferenças quanto a necessidade de fonte de carbono para o crescimento da biomassa e a síntese máxima de astaxantina, corroborando com os estudos observados nesse trabalho. Os níveis desse carotenóide aumentam significativamente quando ocorre um controle no cultivo em condições limitadas de fontes carbono e o contrário ocorre em relação a biomassa. Altos níveis de fonte de carbono no meio, especialmente na fase *lag* e no início da fase exponencial, causam um decréscimo na síntese dos produtos e a produção de álcool etílico e acetaldeído aumentam (VUSTIN, BELYKH & KISHILOVA, 2004).

Embora haja uma maior produção de astaxantina específica nos níveis mais baixos de sacarose (Tabela 9), a produção de astaxantina volumétrica encontra-se em níveis mais altos. Isso ocorre devido a astaxantina volumétrica ser uma relação direta da biomassa com a produção de astaxantina específica, tendo resultado nesse estudo numa maior influência da biomassa.

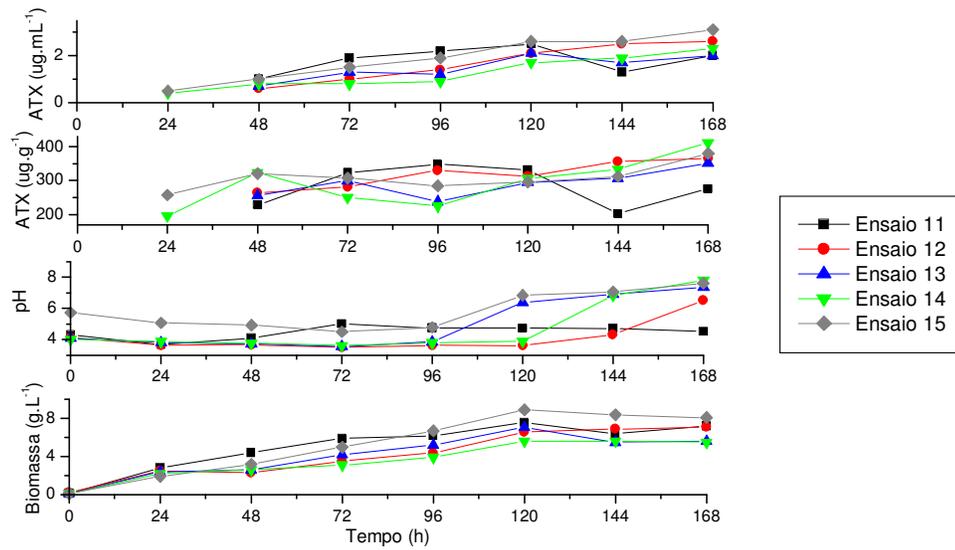
A Figura 9 apresenta o acompanhamento da bioprodução de astaxantina, envolvendo a produção de biomassa, a produção de astaxantina específica e volumétrica e a variação do pH para os ensaios do planejamento fatorial fracionário ao longo do cultivo.



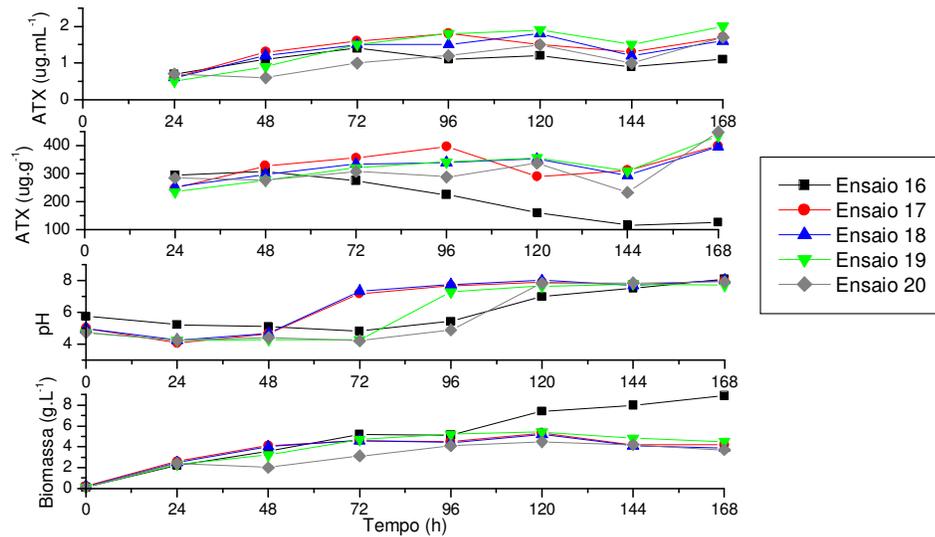
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 9: Acompanhamento da produção de biomassa, do pH, da produção de astaxantina específica e da astaxantina volumétrica ao longo do cultivo para o planejamento experimental fracionário 2_{IV}^{6-2} : ensaio 1 ao 5 (a), ensaio 6 ao 10 (b), ensaio 11 ao 15 (c) e ensaio 16 ao 20 (d).

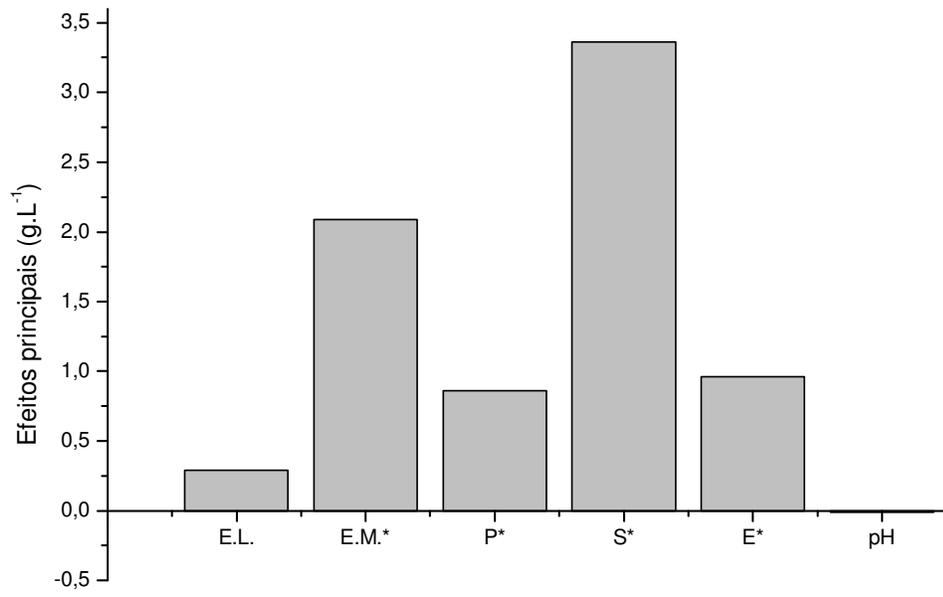
ATX = astaxantina.

Na Figura 9, observa-se que geralmente quanto maior as concentrações dos componentes, mais prolongadas se tornam as quedas do pH e mais tempo demora a obtenção dos máximos de biomassa. Esse fato provavelmente ocorre devido a quantidade de substrato que a levedura tem disponível para metabolizar. Além disso, quanto mais substrato, maior será a quantidade de intermediários carbônicos que ela irá excretar e mais tempo ela irá precisar para reassimilar e estimular a carotenogênese. Esse fato irá refletir no tempo em que o pH irá se manter na faixa do ácido, demorando um pouco mais para conseguir aumentar.

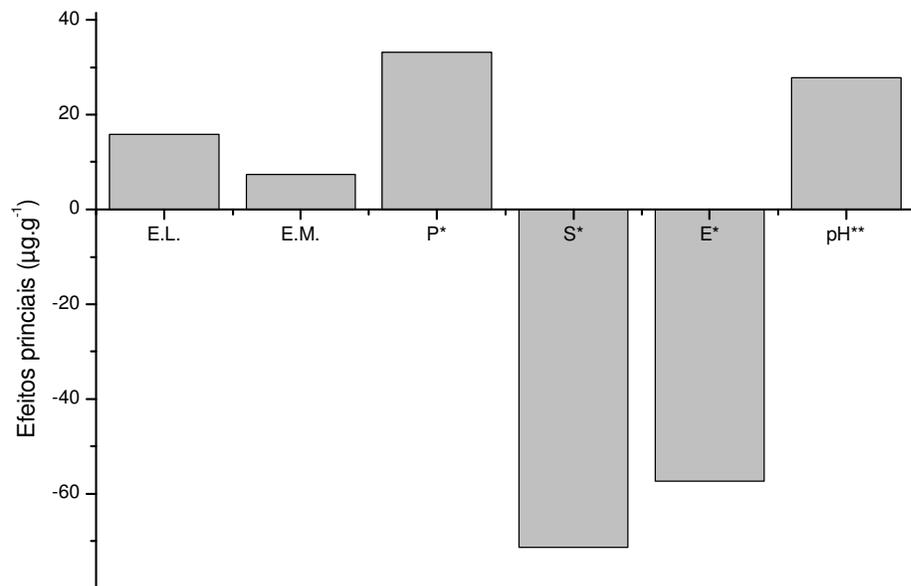
A astaxantina é produzida de forma intracelular, acumulando-se nas células da *Phaffia rhodozyma*. Portanto, a maioria dos picos de produção de astaxantina apresenta-se nos tempos finais de cultivo. Um estudo analisando as cepas de *Phaffia rhodozyma*, demonstraram que culturas velhas contêm mais carotenóides do que culturas jovens, e também um maior número de glóbulos lipídicos, que fazem com que a rigidez das células aumentem (BONFIM, 1999).

Outro fato é que a bioprodução de astaxantina não acompanha o crescimento celular (Figura 9). Isto está de acordo com o observado na biossíntese da astaxantina por leveduras de *Phaffia rhodozyma*, que indicaram que esse processo parece iniciar na fase de crescimento exponencial e continua durante a fase estacionária da levedura (BONFIM, 1999).

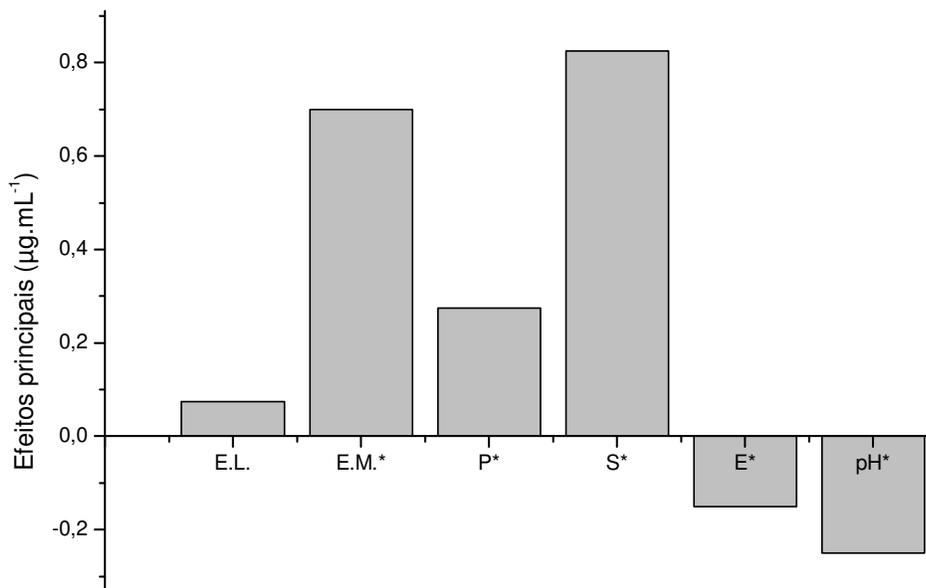
Através das repostas máximas obtidas para cada ensaio do planejamento fracionário 2_{IV}^{6-2} , foi possível realizar a análise dos efeitos das variáveis dos componentes do meio de composição e do pH inicial, sobre as repostas máximas de: produção de biomassa, produção de astaxantina específica e produção de astaxantina volumétrica (Figura 10).



(a)



(b)



(c)

Figura 10: Efeitos principais na bioprodução de astaxantina para: produção de biomassa (a); produção de astaxantina específica (b); produção de astaxantina volumétrica (c). * $p < 0,1$, ** $p < 0,15$

E.L. = extrato de levedura; E.M. = extrato de malte; P = peptona; S = sacarose; E = efluente de parboilização do arroz.

O efeito principal de uma variável independente pode ser entendido como a variação causada na resposta (variável dependente), quando percorremos todos os níveis de variação da variável independente que está sendo avaliada, em separado das demais variáveis (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Na Figura 10, verificou-se que o incremento na concentração de extrato de levedura do nível -1 para o nível +1 não mostrou ser significativo, na faixa estudada, para nenhuma das respostas em estudo.

O aumento da concentração do extrato de levedura também foi observado como não significativo para a bioprodução de carotenóides utilizando outras cepas de *Phaffia rhodozyma*. Num estudo de otimização de fontes de nitrogênio para a produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* 7B12, foram avaliadas 9 fontes: carbamida, amônio acético, NH_4Cl , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, amônio oxálico, peptona, extrato de carne e extrato de levedura. Os autores observaram que o extrato de levedura não apresentou efeito significativo na produção do carotenóide (NI *et al.*,

2007). Porém, o efluente de parboilização do arroz é uma excelente fonte de nitrogênio orgânico, que é passível de incorporação na biomassa. Podendo assim, ter sido preferencialmente utilizado pela levedura, substituindo a fonte de nitrogênio disponível no extrato de levedura.

Ainda, corroborando com esse fato, um estudo da otimização do crescimento celular e da produção de carotenóide pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) ENM 5, através da técnica de planejamento experimental, teve 7 variáveis estudadas: glicose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH, extrato de levedura, água de maceração de milho, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 . Dentre essas variáveis, o extrato de levedura não apresentou efeito estatisticamente significativo (LIU & WU, 2007).

O aumento na concentração de extrato de malte de 1 para 10g.L^{-1} , apresentou um efeito positivo e estatisticamente significativo ($p < 0,1$), aumentando a concentração de biomassa em média de $2,1\text{g.L}^{-1}$ e a produção de astaxantina volumétrica em $0,7\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A modificação na variável independente concentração de peptona de 1 para 10g.L^{-1} , resultou num efeito positivo estatisticamente significativo ($p < 0,1$) para as 3 variáveis dependentes estudadas, incrementando em média $0,9\text{g.L}^{-1}$ na biomassa, $33,2\mu\text{g.g}^{-1}$ na produção de astaxantina específica e $0,3\mu\text{g.mL}^{-1}$ na produção volumétrica de astaxantina.

A fonte de carbono, representada pela sacarose passando de 5 para 20g.L^{-1} apresentou o efeito mais influente, distinto e significativo para todas as respostas. Para a concentração de biomassa e produção volumétrica do carotenóide esse aumento foi positivo, incrementando em média $3,4\text{g.L}^{-1}$ e $0,82\mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, para a produção específica o efeito foi negativo, diminuindo em média $71,4\mu\text{g.g}^{-1}$.

Para a variável efluente de parboilização do arroz, quando a concentração passou do nível -1 para o nível +1 houve um acréscimo na produção da biomassa de em média 1g.L^{-1} . Para a produção de astaxantina específica e volumétrica esse acréscimo na concentração teve efeito negativo, diminuindo em média $57,4\mu\text{g.g}^{-1}$ e $0,15\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

O incremento do pH inicial do meio de 4,0 para 6,0 não apresentou efeito significativo para concentração de biomassa. Porém, na produção de astaxantina específica o efeito foi positivo ($p < 0,15$), aumentando em média a produção específica em $27,8\mu\text{g.g}^{-1}$. E na produção volumétrica mostrou um efeito estatisticamente

significativo ($p < 0,1$) e negativo, diminuindo em média $0,25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na bioprodução do carotenóide. Como o pH teve efeito positivo para astaxantina específica e negativo para a volumétrica, decidiu-se fixar o pH no ponto central. Além deste aspecto outros estudos observaram o pH 5,0 sendo o mais adequado para ambos os casos: crescimento celular e produção de astaxantina (KUSDIYANTINI *et al.*, 1998; HU *et al.*, 2006; LIU & WU, 2007).

A partir do resultados obtidos nesta etapa, decidiu-se que a presença da concentração de extrato de levedura numa faixa inferior a $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ será estudada através de um teste de diferença de médias. As faixas das variáveis extrato de malte ($8,75$ a $16,25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona ($8,75$ a $16,25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e sacarose (15 a $35\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foram ampliadas e a variável efluente ($87,5$ a $162,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) diminuída, visando uma maior bioprodução.

A partir dos resultados obtidos neste planejamento experimental foram selecionadas para próxima etapa do planejamento as seguintes variáveis: extrato de malte ($8,75$ a $16,25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), peptona ($8,75$ a $16,25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarose (15 a $35\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e efluente de parboilização do arroz ($87,5$ a $162,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ampliando as faixas de estudo para maximização da bioprodução de astaxantina. O pH foi fixado em 5,0 e o extrato de levedura foi estudado em um teste de diferença de médias para verificar a continuidade dos experimentos com essa variável.

4.3.2. Teste de Tukey com extrato de levedura

Através da avaliação dos resultados no planejamento fracionário, pode-se perceber que o extrato de levedura não apresentou efeito significativo em nenhuma das respostas avaliadas na faixa de concentração estudada de 1 a $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Provavelmente, esse fato deve ter ocorrido devido ao uso da água de parboilização do arroz, que é rica em nitrogênio orgânico e pode ter sido preferencialmente utilizada pela levedura *P. rhodozyma*, agindo como um substituinte dessa fonte essencial para o seu metabolismo.

Dessa forma, foi feito um cultivo em concentrações inferiores a estudada no planejamento fracionário, com 3 concentrações diferentes de extrato de levedura 0, 0,5 e $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, em triplicata, para que fossem avaliados se há diferença da ausência ou presença em até $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do extrato de levedura para bioprodução do carotenóide visando uma possível eliminação deste constituinte do meio para continuidade do estudo, através do teste de Tukey.

A Figura 11 apresenta a média do comportamento da produção de biomassa, produção de astaxantina específica, produção de astaxantina volumétrica e da variação de pH, para as 3 concentrações de extrato de levedura estudadas, ao longo do cultivo.

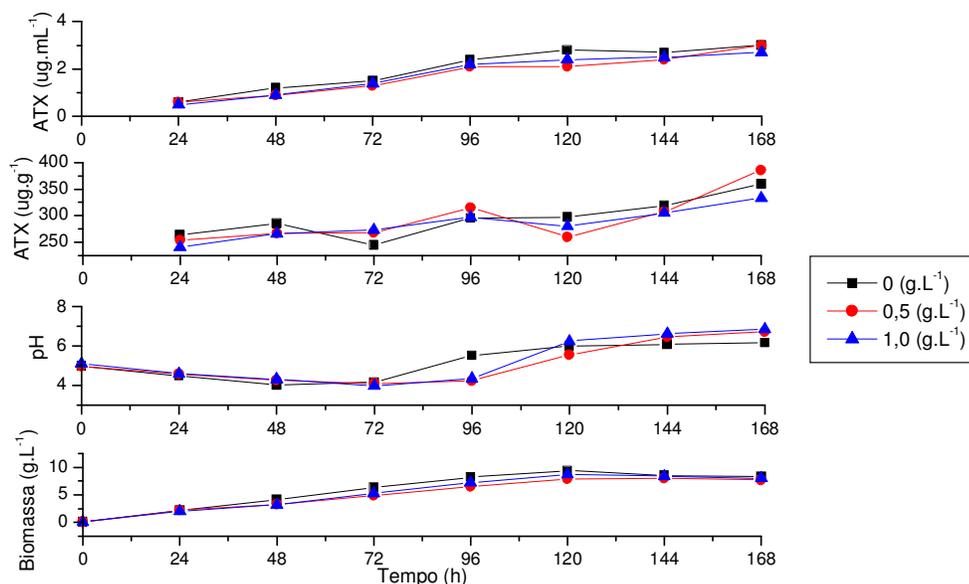


Figura 11: Acompanhamento da média da produção de biomassa, da produção de astaxantina específica, astaxantina volumétrica e variação do pH ao longo do cultivo para o teste com as diferentes concentrações de extrato de levedura.

ATX = astaxantina.

Na Figura 11, pode-se notar que houve pouca diferença na utilização das 3 concentrações de extrato de levedura utilizadas para os parâmetros estudados. A biomassa teve um acréscimo na sua produção para todas as concentrações estudadas até o tempo de 120h e depois se manteve constante até o término da bioprodução. Os valores de crescimento celular máximo atingido para as concentrações de 0, 0,5 e 1g.L⁻¹ foram respectivamente 9,4g.L⁻¹, 8,0g.L⁻¹ e 8,7g.L⁻¹.

Na mesma figura citada anteriormente, o pH tem o comportamento característico das leveduras, decrescendo até o tempo de 72h e 96h, elevando-se nas próximas 24h e se mantém constante até o término do cultivo.

A produção de astaxantina específica foi ascendente ao longo do processo, apresentando os máximos ao final das 168h com $359,5\mu\text{g.g}^{-1}$ (0g.L^{-1}), $385,9\mu\text{g.g}^{-1}$ ($0,5\text{g.L}^{-1}$ de extrato de levedura) e $345,4\mu\text{g.g}^{-1}$ ($1,0\text{g.L}^{-1}$ de extrato de levedura).

A produção de astaxantina volumétrica comportou-se de forma semelhante à específica, chegando ao final da bioprodução nos seguintes valores: $3,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as concentrações de 0 e $0,5\text{g.L}^{-1}$ de extrato de levedura e $2,8\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a concentração 1g.L^{-1} de extrato de levedura.

Na Tabela 10 encontram-se os resultados do teste de Tukey para as concentrações de extrato de levedura estudadas. As respostas avaliadas foram biomassa, produção de astaxantina específica e produção de astaxantina volumétrica. Observa-se que para as respostas produção de astaxantina específica e astaxantina volumétrica não houve diferença significativa entre as médias das concentrações. Para a resposta biomassa houve diferença entre as médias da concentração de extrato de levedura em 0g.L^{-1} e $0,5\text{g.L}^{-1}$ e não houve diferença de ambas em relação a concentração de 1g.L^{-1} . Sendo o efluente de parboilização do arroz uma fonte de nitrogênio substitutiva e não havendo diferença entre a presença ou não do extrato de levedura, optou-se em retirar o extrato de levedura para o seqüenciamento do estudo com o planejamento fatorial completo, visando uma diminuição de custos com o meio de produção.

Tabela 10: Teste de Tukey para as diferentes concentrações de extrato de levedura na bioprodução de astaxantina.

Concentração de extrato de levedura (g.L^{-1})	Biomassa (g.L^{-1})	Astaxantina específica ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Astaxantina volumétrica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
0	$9,3 \pm 0,1^a$	$359,5 \pm 23,1^a$	$3,0 \pm 0,1^a$
0,5	$8,2 \pm 0,3^b$	$385,9 \pm 5,6^a$	$3,0 \pm 0,1^a$
1	$8,8 \pm 0,2^{a,b}$	$345,4 \pm 31,4^a$	$2,8 \pm 0,2^a$

Letras diferentes na mesma coluna representam que há diferença significativa ($p < 0,05$).

4.3.3. Planejamento fatorial completo 2⁴

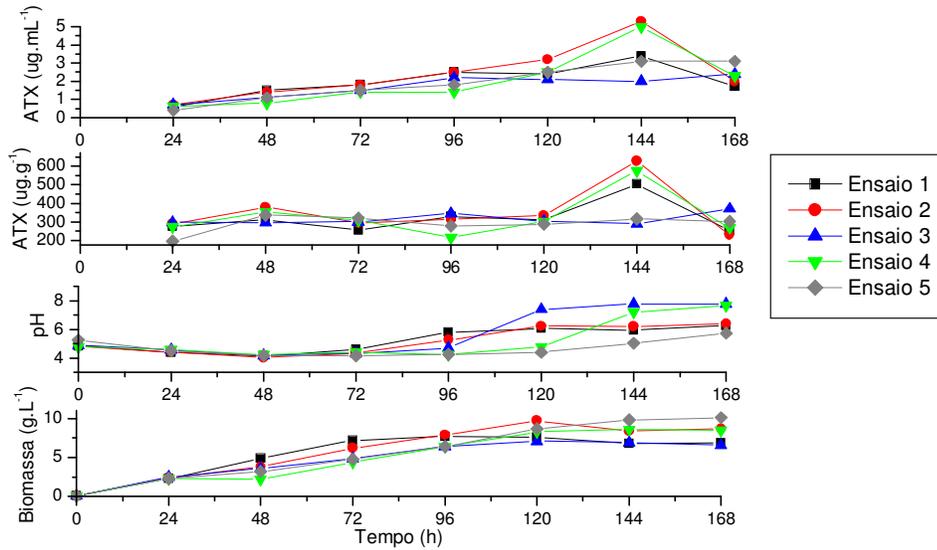
Um planejamento experimental completo 2⁴ foi realizado para avaliar o efeito das concentrações das variáveis: concentração de extrato de malte, de peptona, de sacarose e de efluente de parboilização do arroz. As respostas avaliadas foram o máximo da produção de biomassa, produção de astaxantina volumétrica e específica ao longo do cultivo. Sendo realizado o acompanhamento do consumo de sacarose e variação do pH ao longo do processo, além das respostas em estudo.

A matriz do planejamento completo com os valores reais e codificados das variáveis e suas respectivas respostas estão apresentados na Tabela 11.

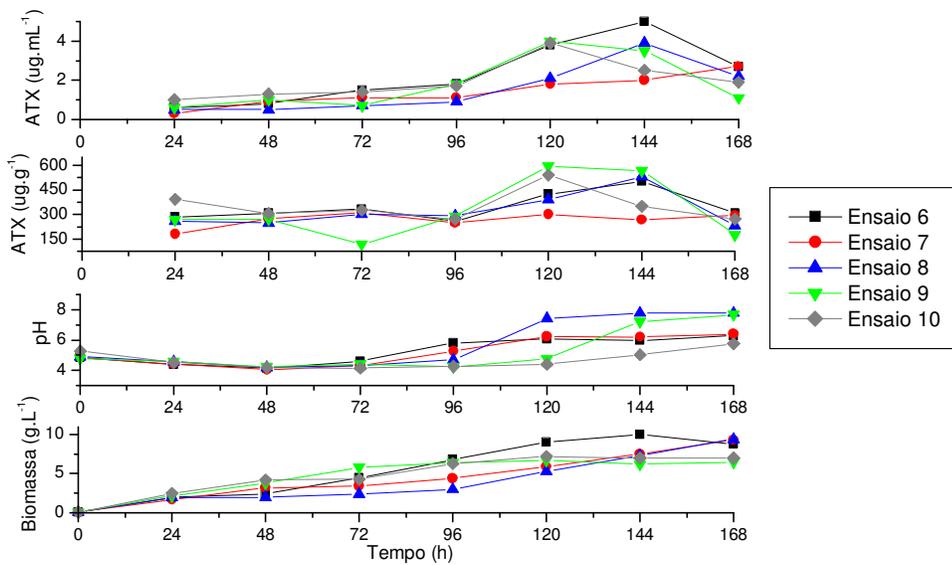
Tabela 11: Matriz do planejamento experimental fracionário 2⁴ com valores reais e codificados, concentração máxima de biomassa, produção máxima de astaxantina específica e produção máxima de astaxantina volumétrica.

Ensaio	Extrato de Malte (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	Sacarose (g.L ⁻¹)	Efluente (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Astaxantina específica (µg.g ⁻¹)	Astaxantina volumétrica (µg.mL ⁻¹)	Astaxantina prevista	Desvio relativo (%)	Açúcar residual (%)
1	8,75 (-1)	8,75 (-1)	15 (-1)	87,5 (-1)	7,6	504,0	3,4	3,3	2,9	6,2
2	16,25 (+1)	8,75 (-1)	15 (-1)	87,5 (-1)	9,7	628,8	5,3	5,4	-1,9	7,8
3	8,75 (-1)	16,25 (+1)	15 (-1)	87,5 (-1)	7,1	370,5	2,4	2,5	-4,2	6,4
4	16,25 (+1)	16,25 (+1)	15 (-1)	87,5 (-1)	8,6	576,5	5,0	4,9	2,0	17,3
5	8,75 (-1)	8,75 (-1)	35 (+1)	87,5 (-1)	10,1	336,0	3,1	3,1	0,0	4,4
6	16,25 (+1)	8,75 (-1)	35 (+1)	87,5 (-1)	10,0	502,4	5,0	4,4	13,6	18,4
7	8,75 (-1)	16,25 (+1)	35 (+1)	87,5 (-1)	9,3	312,2	2,7	2,5	7,4	11,9
8	16,25 (+1)	16,25 (+1)	35 (+1)	87,5 (-1)	9,4	530,1	3,9	3,9	0,0	20,1
9	8,75 (-1)	8,75 (-1)	15 (-1)	162,5 (+1)	6,7	593,6	4,0	3,7	7,5	5,0
10	16,25 (+1)	8,75 (-1)	15 (-1)	162,5 (+1)	7,2	540,8	3,9	3,9	0,0	4,6
11	8,75 (-1)	16,25 (+1)	15 (-1)	162,5 (+1)	7,3	420,0	3,0	2,5	16,7	12,9
12	16,25 (+1)	16,25 (+1)	15 (-1)	162,5 (+1)	8,4	491,6	3,9	3,3	15,4	6,3
13	8,75 (-1)	8,75 (-1)	35 (+1)	162,5 (+1)	10,4	379,5	3,6	3,7	2,8	4,0
14	16,25 (+1)	8,75 (-1)	35 (+1)	162,5 (+1)	10,9	355,3	2,9	2,9	0,0	11,9
15	8,75 (-1)	16,25 (+1)	35 (+1)	162,5 (+1)	9,0	485,3	3,5	3,1	11,4	8,2
16	16,25 (+1)	16,25 (+1)	35 (+1)	162,5 (+1)	7,9	399,6	2,3	2,3	0,0	9,2
17	12,5 (0)	12,5 (0)	25 (0)	125 (0)	8,6	402,6	2,6	3,5	-20,7	3,1
18	12,5 (0)	12,5 (0)	25 (0)	125 (0)	8,0	424,2	2,7	3,5	-29,6	5,4
19	12,5 (0)	12,5 (0)	25 (0)	125 (0)	9,6	351,9	2,8	3,5	-25,0	3,2

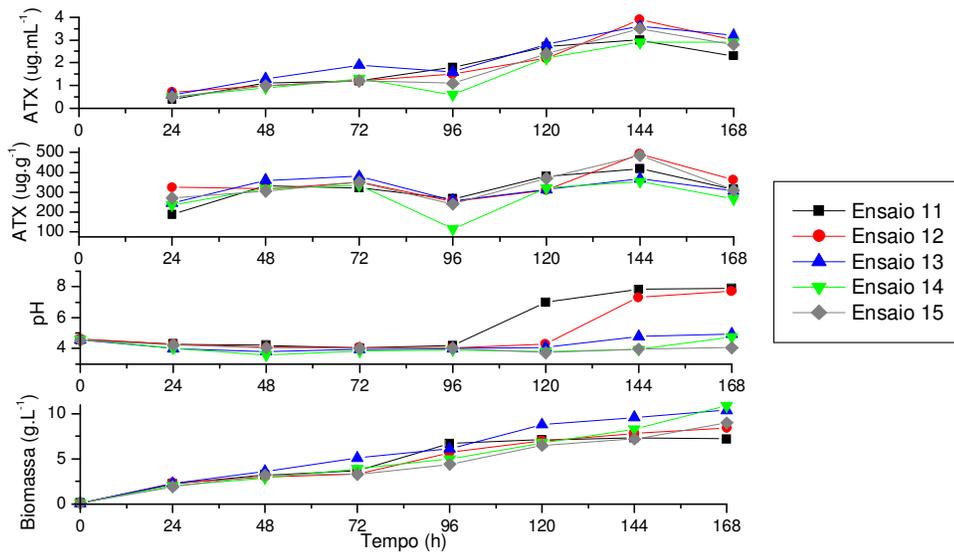
A Figura 12 apresenta o acompanhamento da produção de biomassa, da produção de astaxantina específica, da produção de astaxantina volumétrica e a variação do pH, para os ensaios do planejamento fatorial completo.



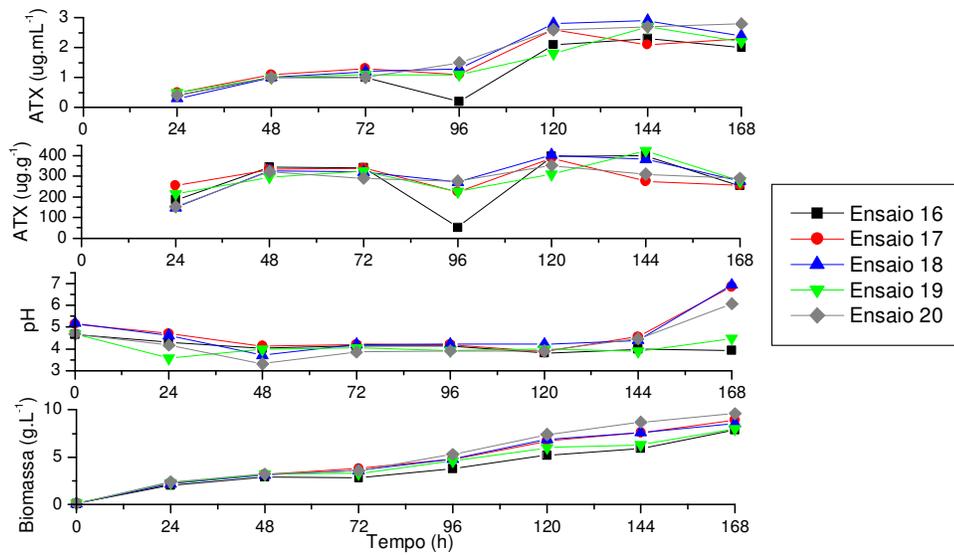
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12: Acompanhamento da produção de biomassa, da produção de astaxantina específica, da astaxantina volumétrica e da variação do pH, ao longo do cultivo para o planejamento experimental completo 2⁴: ensaio 1 ao 5 (a); ensaio 6 ao 10 (b); ensaio 11 ao 15 (c); e ensaio 16 ao 20 (d).

ATX: astaxantina.

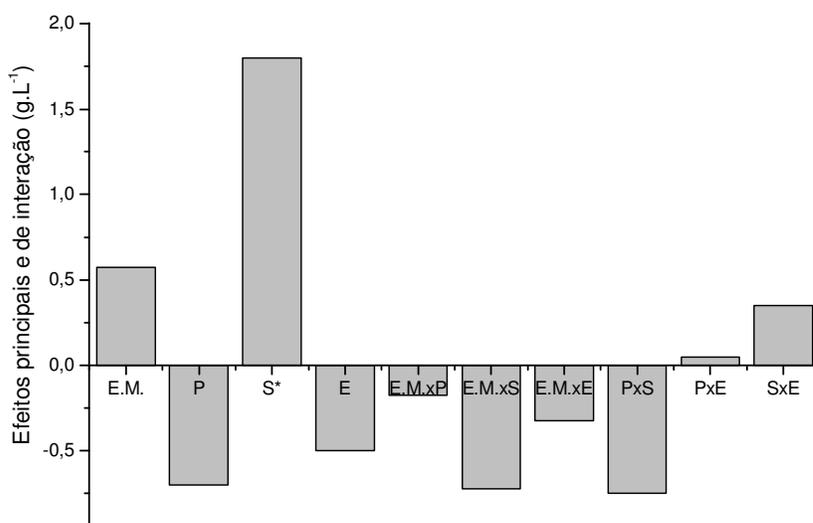
Na Tabela 11 e Figura 12, pode observar que os máximos de biomassa alcançados variaram de $6,7\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 7) a $10,9\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 14). Para produção de astaxantina específica, essa variação foi de $312,2\mu\text{g.g}^{-1}$ (ensaio 7) para $628,8\mu\text{g.g}^{-1}$ (ensaio 2). Na produção volumétrica foi observado o mesmo comportamento variando de $2,3\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ensaio 16) a $5,3\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ensaio 2). Todas as respostas apresentaram valores superiores ao planejamento fracionário: $8,9\text{g.L}^{-1}$, $538,4\mu\text{g.g}^{-1}$ e $3,1\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O açúcar residual variou de 3,1% (ensaio 17) a 20,1% (ensaio 8).

Na Figura 12, nota-se que o pH continua a prolongar o período de queda conforme aumentam as concentrações dos componentes do meio de cultivo, corroborando com o planejamento fracionário estudado no item 4.3.1.

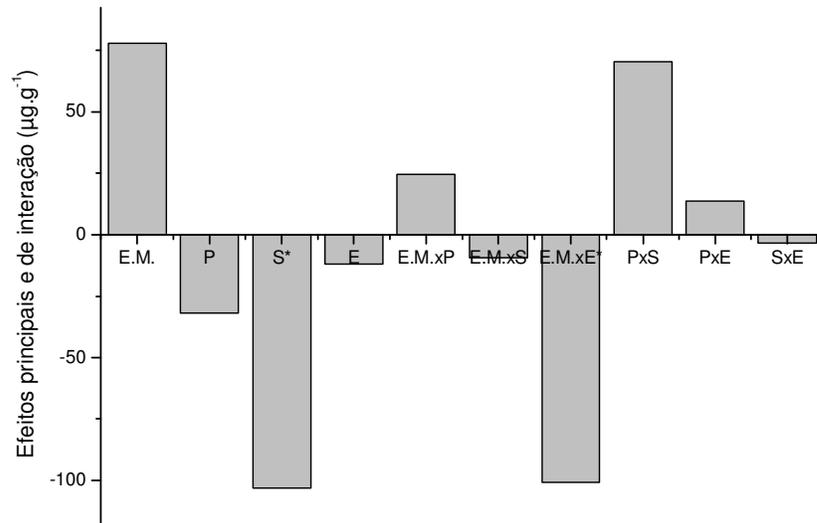
A Figura 13 apresenta os gráficos de efeitos principais para a produção de biomassa, produção de astaxantina específica e volumétrica. Nessa figura, verifica-se que para a biomassa a única variável com efeito significativo positivo é a sacarose, aumentando essa resposta em torno de $1,8\text{g.L}^{-1}$ quando passa do nível -1 (15g.L^{-1}) para o nível +1 (35g.L^{-1}).

Para a produção de astaxantina específica, a sacarose também apresentou efeito estatisticamente significativo, porém negativo. Essa resposta também mostrou efeito da interação do extrato de malte e do efluente negativo.

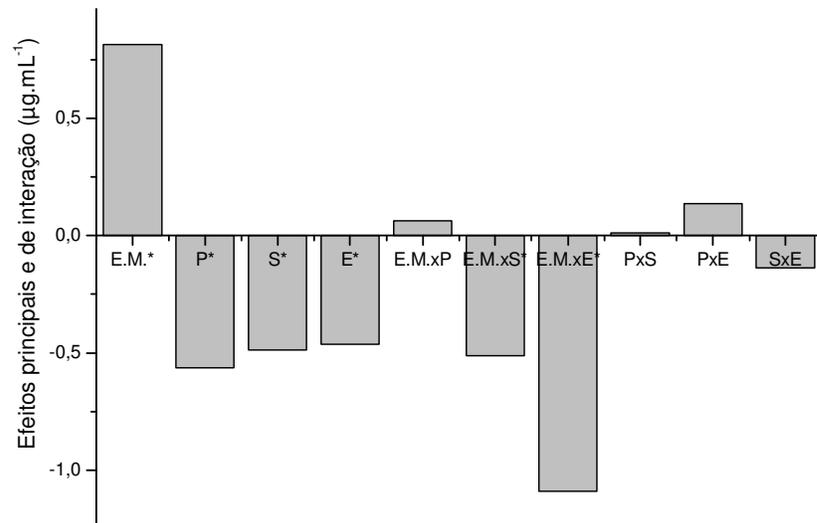
Para a produção de astaxantina volumétrica o efeito de todas as variáveis foi significativo, com exceção das interações da peptona com as demais variáveis e da sacarose com o efluente.



(a)



(b)



(c)

Figura 13: Efeitos principais e de interação na bioprodução de astaxantina para: produção de biomassa (a); produção de astaxantina específica (b); produção de astaxantina volumétrica (c). * $p < 0,05$

E.L. = extrato de levedura; E.M. = extrato de malte; P = peptona; S = sacarose; E = efluente de parboilização do arroz.

Através da análise de variância (ANOVA), verificou-se que não foi possível obter um modelo para a produção de biomassa e produção de astaxantina específica.

Para verificação de um modelo linear para bioprodução de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268, considerando as variáveis: extrato de malte, peptona, sacarose e efluente de parboilização do arroz, foram calculados os coeficientes de regressão e feita a ANOVA. Os resultados estão apresentados na Tabela 12 e 13.

Tabela 12: Coeficientes de regressão e erro padrão para produção de astaxantina volumétrica.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t (2)	P
Média*	3,59	0,02	152,1	0,000043
(1) Extrato de malte*	0,81	0,50	16,2	0,003766
(2) Peptona*	-0,56	0,50	-11,2	0,007809
(3) Sacarose*	-0,49	0,50	-9,8	0,010356
(4) Efluente*	-0,46	0,50	-9,2	0,011486
1 x 2	0,06	0,50	1,2	0,337734
1 x 3*	-0,51	0,50	-10,2	0,009384
1 x 4*	-1,09	0,50	-21,8	0,002107
2 x 3	0,01	0,50	0,2	0,825922
2 x 4	0,14	0,50	2,8	0,110703
3 x 4	-0,14	0,50	-2,8	0,110703

*valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Tabela 13: Análise de variância para bioprodução de astaxantina volumétrica do planejamento experimental completo 2^4 .

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	12,48	6	2,08	10
Resíduo	2,52	12	0,21	
Falta de ajuste	2,5	10		
Erro puro	0,02	2		
Total	14,0	18		

Coefficiente de correlação R: 0,82

% variação explicada ($R^2 = 0,67$)

% máxima variação explicável $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 99,86$

$F_{0,95; 6; 12} = 3,0$

Observando a Tabela 12 é possível perceber que todos os termos dos coeficientes de regressão das variáveis independentes obtidos foram estatisticamente significativos a 95% de confiança e para as interações só foram significativos os coeficientes entre o extrato de malte e a sacarose e entre o extrato de malte e o efluente. Sendo assim, os coeficientes que não apresentaram significância ($p < 0,05$) foram incorporados a falta de ajuste para o cálculo da ANOVA que está apresentada na Tabela 13.

A variação explicada (R^2) pelo modelo foi boa, cerca de 70% e o coeficiente de correlação (R) foi de 0,82, que mostra que o modelo obtido é bom para explicar o processo estudado. A partir do valor da máxima variação explicável de 99,86%, pode-se notar que o erro puro do processo foi muito pequeno, em torno de 0,1%

$$\begin{aligned} \text{Astaxantina volumétrica} = & 3,49 + 0,41(\text{Extrato de malte}) - 0,28(\text{Peptona}) - \\ & 0,24(\text{Sacarose}) - 0,23(\text{Efluente}) - 0,26(\text{Extrato de malte x Sacarose}) - \\ & 0,54(\text{Extrato de malte x Efluente}) \end{aligned} \quad (2)$$

Foram calculados, conforme apresentado na Tabela 11, os desvios relativos entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo, mostrando que a Equação 2 prevê bem o comportamento da bioprodução de astaxantina frente a variação da concentração do extrato de malte, peptona, sacarose e efluente de

parboilização do arroz. Os desvios devem ficar abaixo de 20% para ser aceitável para processos fermentativos (MANERA, 2006), o que não ocorreu somente para os pontos centrais.

A partir do modelo obtido foi possível construir as superfícies de contorno (Figura 14), para analisar as melhores condições de concentração de extrato de malte, peptona, sacarose e efluente de parboilização do arroz para a maximização da produção de astaxantina volumétrica.

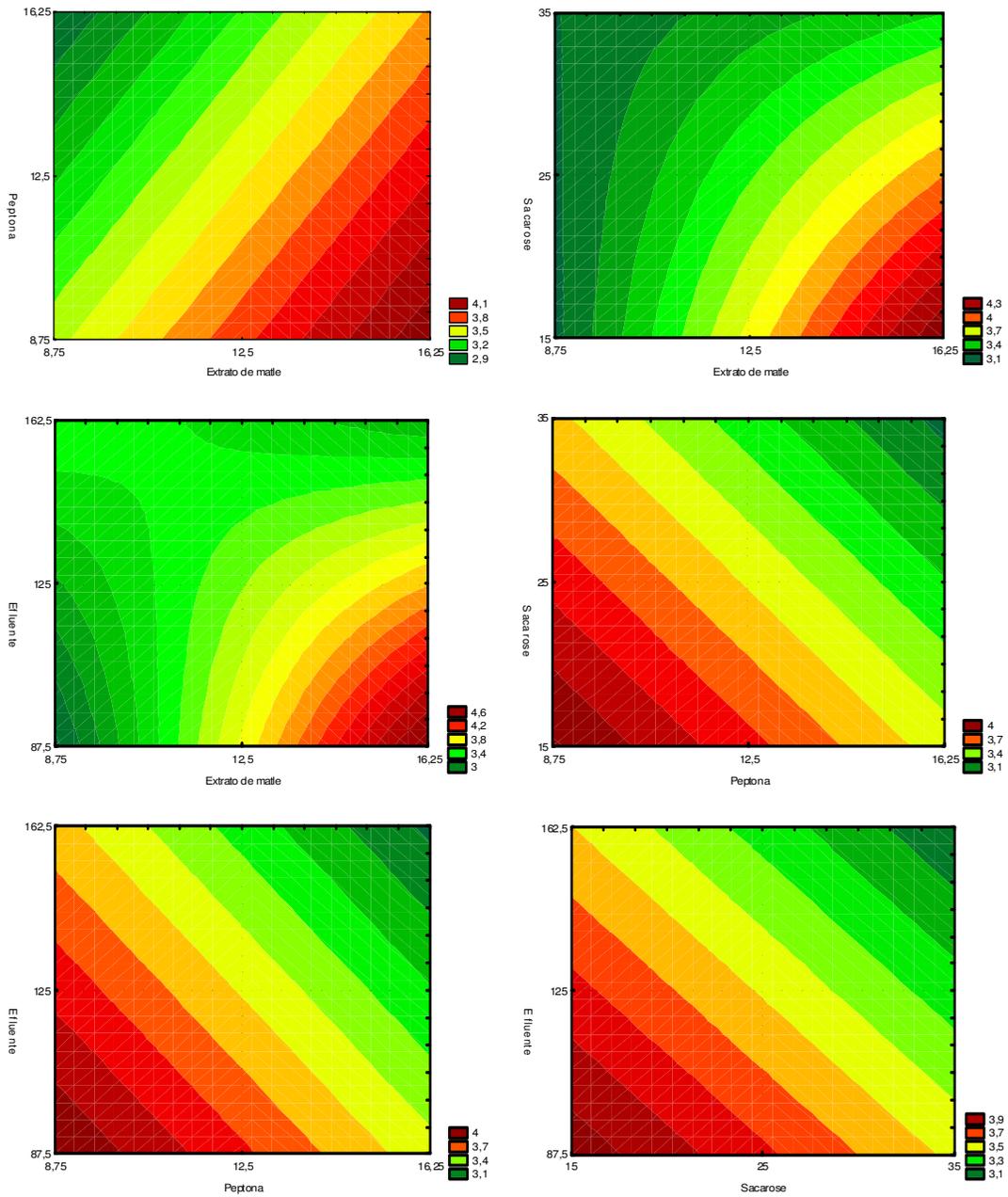


Figura 14: Superfícies de contorno para a produção de astaxantina volumétrica como função da concentração do extrato de malte e da peptona; do extrato de malte e da sacarose; do extrato de malte e do efluente; da peptona e da sacarose; da peptona e do efluente; da sacarose e do efluente.

Através da análise das superfícies, verifica-se que para obter altas produções de astaxantina volumétrica, deve-se trabalhar com elevadas concentrações de extrato de malte e com baixos valores de peptona, sacarose e água de parboilização do arroz. Assim, verifica-se que a condição para maximizar essa produção é uma concentração de extrato de malte de $16,25\text{g.L}^{-1}$, concentração de peptona de $8,75\text{g.L}^{-1}$, concentração de sacarose de 15g.L^{-1} e de efluente de parboilização do arroz de $87,5\text{g.L}^{-1}$, atingindo uma produção de astaxantina volumétrica de $5,4\mu\text{g.mL}^{-1}$, prevista pelo modelo.

Para a validação do modelo empírico está apresentado o ensaio 2 (Tabela 11), onde as variáveis se encontram nos níveis verificados para a maximização da bioprodução de astaxantina: extrato de malte no nível +1 ($16,25\text{g.L}^{-1}$); peptona no nível -1 ($8,75\text{g.L}^{-1}$); sacarose no nível -1 (15g.L^{-1}) e água de parboilização de arroz no nível -1 ($87,5\text{g.L}^{-1}$). A Figura 15 mostra a cinética do ensaio 2, em que pode-se observar que a biomassa alcançou o valor de $9,7\text{g.L}^{-1}$, a produção de astaxantina específica $628,8\mu\text{g.g}^{-1}$ e a produção de astaxantina volumétrica $5,3\mu\text{g.mL}^{-1}$.

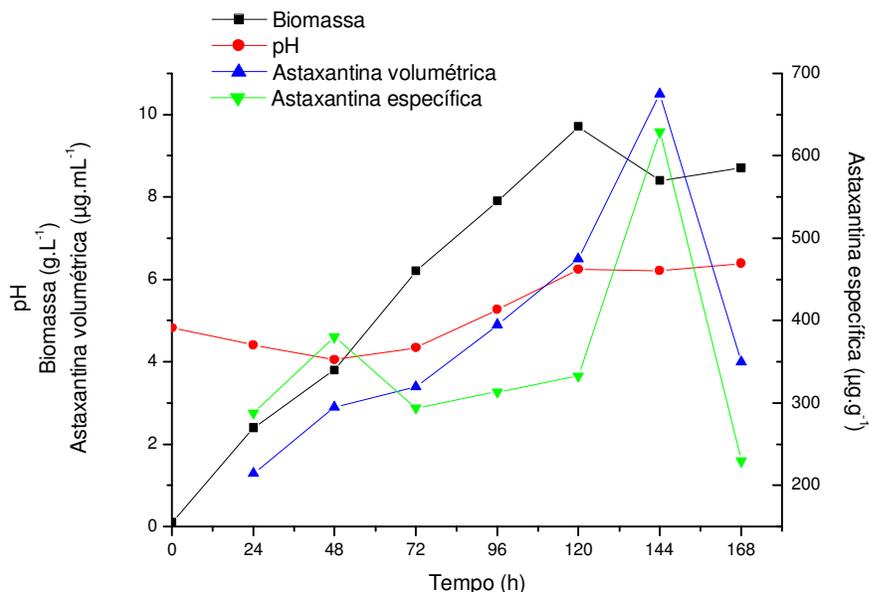


Figura 15: Acompanhamento cinético do ensaio 2 do planejamento completo 2^4 .

A Figura 16 apresenta a superfície de resposta com as variáveis sacarose e efluente de parboilização do arroz fixadas no nível -1, condições para a maximização da bioprodução de astaxantina.

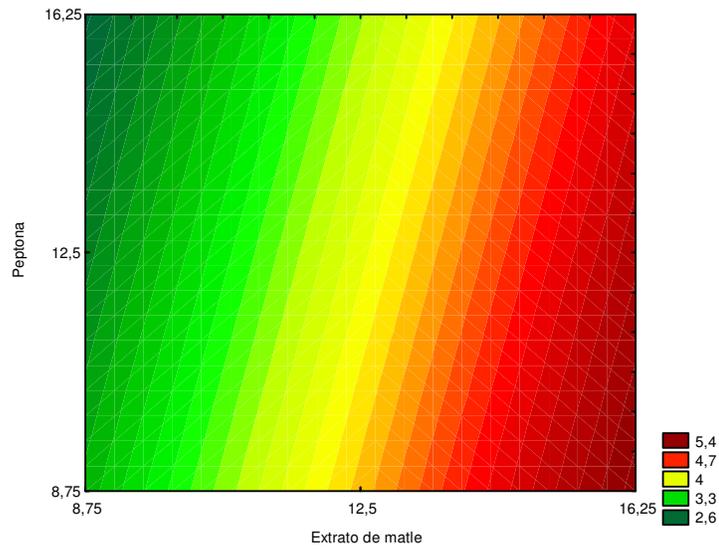


Figura 16: Superfície de resposta com as variáveis sacarose e efluente de parboilização do arroz fixadas no nível -1.

Na Figura 16, observa-se que fixando as variáveis sacarose e efluente no nível -1, tem-se a maximização da produção de astaxantina volumétrica no nível +1 ($16,25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) da sacarose e no nível -1 ($8,75\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) da peptona e assim atingindo o valor máximo de $5,4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A Figura 17 apresenta uma ilustração do ensaio 2 do planejamento completo através do cultivo submerso pela levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268.

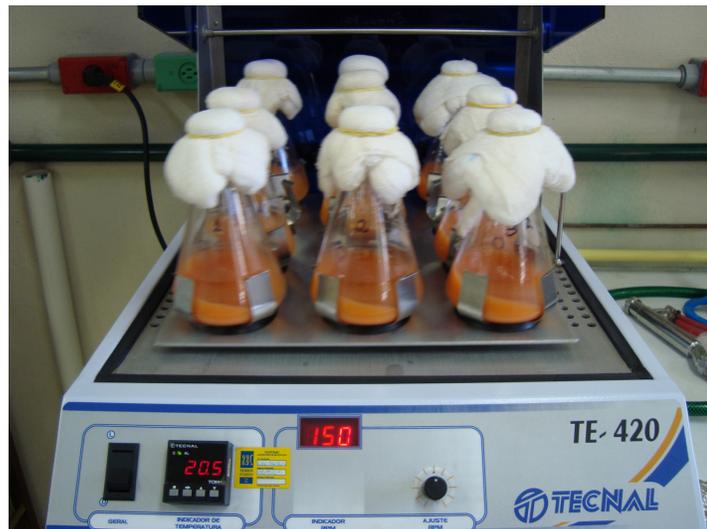


Figura 17: Cultivo submerso da levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268.

A Tabela 14 apresenta os resultados de produção específica e volumétrica de algumas cepas selvagens e mutantes, em que podemos observar que todos os valores de astaxantina volumétrica encontrados nas cepas selvagens são inferiores aos obtidos nesse trabalho. Exceto ao estudo realizado com a mesma cepa (NRRL Y-17268), utilizando um meio de cultivo contendo xilose suplementado com fontes de nitrogênio orgânico em concentrações de 5g.L^{-1} , que favoreceu provavelmente a produção de astaxantina, obtendo $5,2\text{mg.mL}^{-1}$ do carotenóide.

Com relação as cepas mutantes, que sofrem alterações genéticas para se tornarem hiperprodutoras, pode-se notar que nem sempre os valores obtidos são tão superiores aos encontrados pelas cepas selvagens. Como a levedura *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501, *Phaffia rhodozyma* 2A2N e *Phaffia rhodozyma* 7B12, que apresentaram uma produção volumétrica de $9,1$; $8,1$ e $7,71\text{mg.L}^{-1}$, inferiores as demais cepas mutantes e bem próximos aos encontrados pelas cepas selvagens.

Tabela 14: Produção específica e volumétrica de astaxantina por cepas selvagens e mutantes de *Phaffia rhodozyma*.

Cepa	Astaxantina específica	Astaxantina volumétrica	Referência
Selvagens			
<i>Phaffia rhodozyma</i> 67-385	550,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$		Schroeder & Johnson, 1995(b)
<i>Phaffia rhodozyma</i> ATCC 24228		1,8 mg.L^{-1}	Parajó <i>et al.</i> , 1997
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-17268		3,60 mg.L^{-1}	Vázquez, Santos & Parajó, 1997
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-10921		1,63 mg.L^{-1}	Vázquez, Santos & Parajó, 1997
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-10922		3,05 mg.L^{-1}	Vázquez, Santos & Parajó, 1997
<i>Phaffia rhodozyma</i> ATCC 24228		2,14 mg.L^{-1}	Cruz & Parajó, 1998
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-17268		5,2 mg.mL^{-1}	Parajó, Santos & Vázquez, 1998
<i>Phaffia rhodozyma</i> 67-385	310 $\mu\text{g.g}^{-1}$		An, Cho & Johnson, 1999
<i>Phaffia rhodozyma</i> ATCC 24202		2,37 mg.L^{-1}	Chociai <i>et al.</i> , 2002
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-10921	850 $\mu\text{g.g}^{-1}$		Dominguez-Bocanegra & Torres-Muñoz, 2004
<i>Phaffia rhodozyma</i> ATCC 24202	383,73 $\mu\text{g.g}^{-1}$		Moriel <i>et al.</i> , 2005
<i>Phaffia rhodozyma</i> AS 2.1557		3,5 mg.L^{-1}	Wang, Yu & Zhou, 2006
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-10921	1.850 $\mu\text{g.g}^{-1}$		Dominguez-Bocanegra, Ponce-Noyola & Torres-Muñoz, 2007
<i>Phaffia rhodozyma</i> Past-1	1516,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$		Ni <i>et al.</i> , 2008
Mutantes			
<i>Phaffia rhodozyma</i> PR190	1,8 mg.g^{-1}	33,7 mg.L^{-1}	Kusdiyantini <i>et al.</i> , 1998
<i>Phaffia rhodozyma</i> PR-18	481,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$		Bonfim, 1999
<i>Phaffia rhodozyma</i> 25-2		8,1 mg.L^{-1}	Ramírez, Gutierrez & Gschaedler, 2001
<i>Phaffia rhodozyma</i> 2A2N		40,0 mg.L^{-1}	An, Jang & Cho, 2001
<i>Phaffia rhodozyma</i> NCHU-FS501		9,1 mg.L^{-1}	Fang & Wang, 2002
<i>Phaffia rhodozyma</i> VKPM Y-2409	7,0 mg.g^{-1}		Vustin, Belykh & Kishilova, 2004
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> 46	1,52 mg.g^{-1}	27,05 mg.L^{-1}	Hu <i>et al.</i> , 2006
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ZJUT003	2,57 mg.g^{-1}	52,32 mg.L^{-1}	Zheng <i>et al.</i> , 2006
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ENM 5	1,56 mg.g^{-1}	14,5 mg.L^{-1}	Liu & Wu, 2006
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ENM 5	1,15 mg.g^{-1}	18,6 mg.L^{-1}	Liu & Wu, 2007
<i>Phaffia rhodozyma</i> 7B12	1,00 mg.g^{-1}	7,71 mg.L^{-1}	Ni <i>et al.</i> , 2007

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados durante este trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Dentre as 3 cepas estudadas da levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268, NRRL Y-10921 e NRRL Y-10922, a que se apresentou como a mais promissora na bioprodução de astaxantina foi a cepa NRRL Y-17268. Este microrganismo alcançou uma produção máxima de 7g.L^{-1} de concentração celular, $350,2\mu\text{g.g}^{-1}$ de astaxantina específica e $2,4\mu\text{g.mL}^{-1}$ de astaxantina volumétrica. Sendo selecionada para os estudos da maximização da produção do carotenóide, através da metodologia do planejamento experimental e análise das superfícies de contorno.

- No planejamento fracionário 2_{IV}^{6-2} , pode-se concluir que o aumento na concentração da sacarose foi a variável que mais influenciou no cultivo de astaxantina para alcançar o máximo de concentração celular e produção de astaxantina volumétrica, sendo o efeito inverso observado para a produção de astaxantina específica. Através dos efeitos observados visando o aumento da bioprodução do carotenóide, foi visto a necessidade da ampliação das faixas de sacarose, extrato de malte e peptona e o estreitamento da faixa de concentração da água de parboilização do arroz. Os valores máximos obtidos nesse planejamento foram $8,9\text{g.L}^{-1}$ de biomassa, $538,4\mu\text{g.g}^{-1}$ de astaxantina específica e $3,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de astaxantina volumétrica.

- A presença do extrato de levedura nos meios de cultivo estudados mostrou-se desnecessária, verificado através do Teste de Tukey, permitindo a retirada deste constituinte do meio de produção.

- Através do planejamento experimental completo 2^4 , concluiu-se que somente a produção de astaxantina volumétrica apresentou um modelo linear e as melhores condições para a maximização da bioprodução foram: concentração de extrato de malte $16,25\text{g.L}^{-1}$, concentração de peptona $8,75\text{g.L}^{-1}$, concentração de sacarose 15g.L^{-1} , concentração de efluente de parboilização do arroz $87,5\text{g.L}^{-1}$, pH inicial 5,0, à 25°C , 150rpm durante 168h. Nessas condições a produção de astaxantina volumétrica alcançou $5,3\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados e conclusões obtidos neste trabalho sugere-se para trabalhos futuros:

- Avaliar um meio de cultura contendo um substrato que seja rico em sacarose, como o caldo da cana-de-açúcar.
- Otimizar o meio de cultura para bioprodução de astaxantina em relação a agitação e aeração.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. 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.

AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, p.527-537, 2004.

AMATO, G. W.; SILVEIRA, S. F. Parboilização do arroz no Brasil. Porto Alegre: **CIENTEC**. Boletim Técnico, 98 p., 1991.

AMOBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.19, n.2, p.223-243, 2006.

AN, G.; CHO, M.; JOHNSON, E. A. Monocyclic Carotenoid Biosynthetic Pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, n.2, p.189-193, 1999.

AN, G.; JANG, B.; CHO, M. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.2, p.121-125, 2001.

ANDREWS, A. G.; PHAFF, H. .J.; STARR, M. P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, v.15, p.1003-1007, 1976.

AOAC – **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Arlington, Virginia. USA, 1995.

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

AUGUSTI, P. R. **Efeito dos carotenóides licopeno e astaxantina sobre danos renais induzidos por cloreto de mercúrio.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BJERKENG, B.; PEISKER, M.; VON SCHWARTZENBERG, K.; YTRESTOYL, T.; ASGARD, T. Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. **Aquaculture**, v.269, p.467-489, 2007.

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

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.

CANNIZZARO, C.; CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, J.; SOTCKAR, U. V. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using ¹³C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. **Metabolic Engineering**, n.6, p.340-351, 2004.

CHOCIAI, M. B.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; CHOCIAI, J. G.; BUSATO, S. B.; BONFIM, T. M. B. Cultura da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p.457-462, 2002.

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.

CRUZ, J. M.; PARAJÓ, J. C. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 479-484, 1998.

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

DEAN, K. L. I. B. Market forecast: biopigments. **Industrial Bioprocessing**, v.14, n.5, p.4-5, 1992.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.66, p.249-252, 2004.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; PONCE-NOYOLA, T.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Appl. Microbiology and Biotechnology**, n.75, v.783-791, 2007.

FANG, T. J.; WANG, J. Extractability of astaxanthin in mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. **Process Biochemistry**, v.37, p.1235-1245, 2002.

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.

FONTANA, J. D.; CZECZUGA, B.; BONFIM, T. M. B.; CHOCIAI, M. B.; OLIVEIRA, B. H.; GUIMARÃES, M. F.; BARON, M. Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, n.58, p.121-125, 1996.

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

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

GOTO, S.; KENTARO, K.; ABE, K.; KIMATA, Y.; KITAHAMA, K.; YAMASHITA, E.; TERADA, H. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1512, p.251-258, 2001.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, F. M.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.46, p.185-196, 2006.

HU, Z.; ZHENG, Y.; WANG, Z.; SHEN, Y. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.586-590, 2006.

JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, v.115, p.173-183, 1979.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Crit. Rev. Biotechnology**, v.11, p.297-326, 1991.

KRINSKY, N. I. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. **Am. J. Clin. Nutr.** v.53, p.238, 1991.

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. **Biotechnology Letters**, v.20, n.10, p.929-934, 1998.

LAI, J.; JIANG, Y.; HE, X.; HUANG, J.; CHEN, F. Separation and determination of astaxanthin from microalgal and yeast samples by molecularly imprinted microspheres. **Journal of Chromatography B**, v.804, p.25-30, 2004.

LIM, G.; LEE, S.; LEE, E.; HAAM, S.; KIM, W. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide carbon. **Biochemical Engineering Journal**, v.11, p.181-187, 2002.

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Use of *n*-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.1033-1038, 2006.

LIU, Y. S.; WU, J. Y.; HO, K. P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p.331-335, 2006.

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

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

MANERA, A. P. **Otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima**. Dissertação (Mestrando em Engenharia e Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

MORIEL, D. G.; CHOCIAI, M.B.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; BONFIM, T. M. B. Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.3, p.397-401, 2005.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal Agr. Food Chemistry**. v.48, p.1150-1154, 2000.

NI, H.; CHEN, Q.; RUAN, H.; YANG, Y.; LI, L.; WU, G.; HU, Y.; HE, G. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v.8, n.5, p.365-370, 2007.

NI, H.; CHEN, Q.; HE, G.; WU, G.; YANG, Y. Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v.9, n.1, p.51-59, 2008.

O'CONNOR, I.; O'BRIEN N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v.16, p.226-230, 1998.

PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M.; CRUZ, J. M. Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed wood. **Food Chemistry**, v.60, n.3, p.347-355, 1997.

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

PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para aqüicultura**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PERSIKE, D. S.; BONFIM, T. M. B.; SANTOS, M. H. R., LYNG, S. M. O.; CHIARELLO, M. D.; FONTANA, J. D. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). **Bioresource Technology**, v.82, p.79-85, 2002.

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R. Caracterização do efluente da parboilização do arroz. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, n.3, p.139-143, 1997.

RAMÍREZ, J.; GUTIERREZ, H.; GSCHAEDLER, A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, v.88, p.259-268, 2001.

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUEZ-AMAYA, B. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. OMNI Research, ILSI Human Nutritional Institute, Washington, 64 p, 2001.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **Journal of Industrial Microbiology**, v.14, p.502–507, 1995 (a).

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.31, p.18374-18379, 1995 (b).

SCHWARTZ, S. H. **Apocarotenoids and Carotenoid Cleavage Dioxygenases**. Disponível em <<http://www.msu.edu/~schwartz1/apocarotenoids.htm>>. consultado em 23/12/2003.

Standard Methods for the examination of water and wastewater, Ed. 19, 1995.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; JÚNIOR, A. F.; LUCCIO, M. Kinetic and Stoichiometric Parameters in the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in synthetic and agroindustrial media. **Appl. Biochemistry and Biotechnology**, v.157, n.1, p.61-69, 2009.

VÁZQUEZ, M.; SANTOS, V.; PARAJÓ, J. C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.263-268, 1997.

VUSTIN, M. M.; BELYKH, E. N.; KISHILOVA, S. A. Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Microbiology**, v.73, n.6, p.643-649, 2004.

WANG, W.; YU, L.; ZHOU, P. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v.97, p.26-31, 2006.

ZENI, P. **Screening de microrganismos produtores de carotenóides e poligalacturonases**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2009.

ZHANG, Y.; RITTMANN, B. E.; WANG, J.; SHENG, Y.; YU, J.; SHI, H.; QIAN, Y. High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, v.40, n.857-863, 2005.

ZHENG, Y.; HU, Z.; WANG, Z.; SHEN, Y. Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Food and Bioproducts Processing**, v.84, n.C2, p.164-166, 2006.

ANEXOS

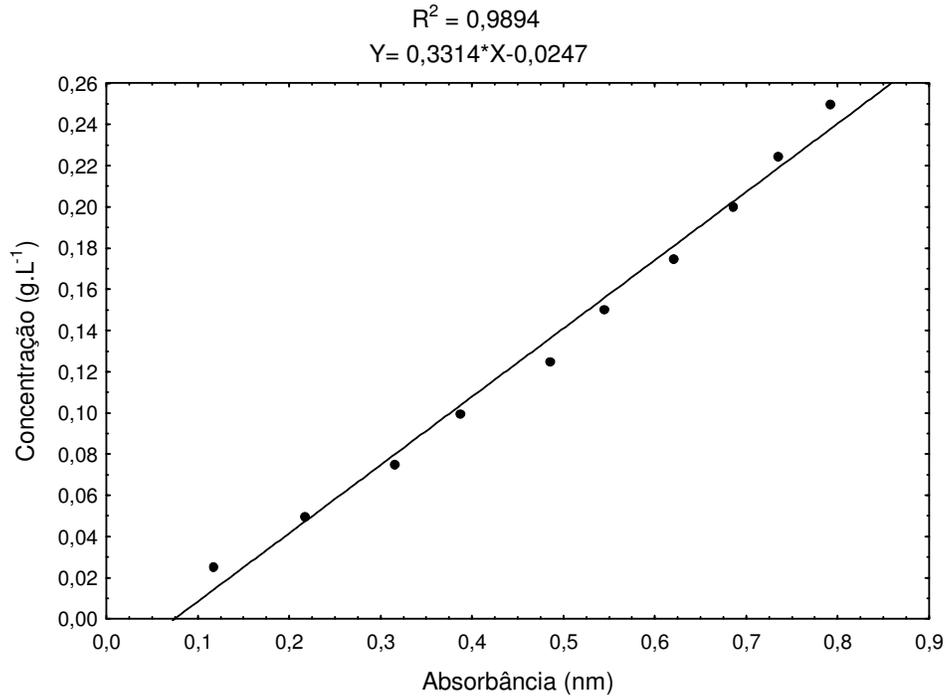


Figura 1: Curva padrão de biomassa da cepa 17268.

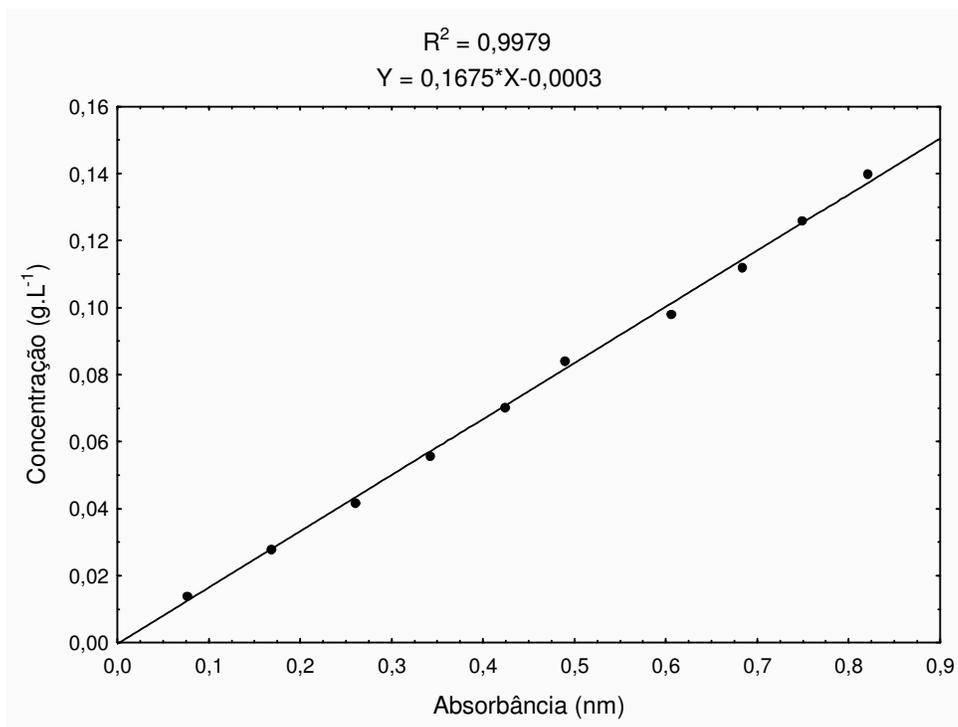


Figura 2: Curva padrão de biomassa da cepa 10921.

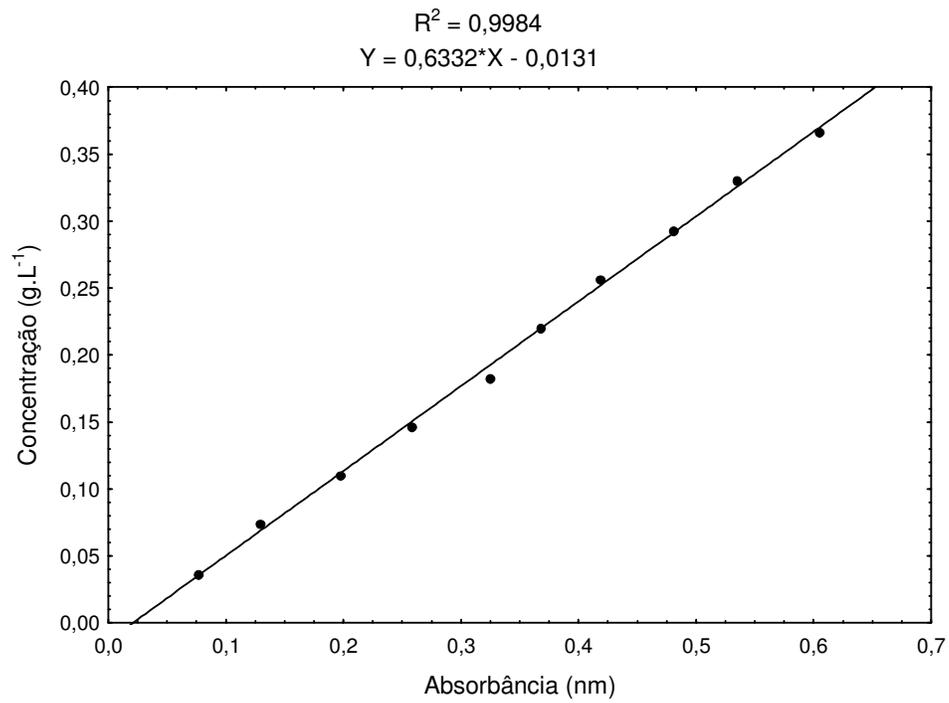


Figura 3: Curva padrão de biomassa da cepa 10922.