



Área: Engenharia de Alimentos

COMPORTAMENTO ESTEQUIOMÉTRICO DA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR PHAFFIA RHODOZYMA Y-17268 EM BIORREATOR SISTEMA SEMICONTÍNUO EMPREGANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Rosicler Colet*, Luana Gayeski, Clarice Steffens, Eunice Valduga

Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS

*E-mail: rosicler.colet@yahoo.com.br

RESUMO – A produção de carotenoides por rota biotecnológica tem se expandido nos últimos anos, essa resulta em produtos seguros para aplicação em alimentos, sendo considerados produtos naturais e por permitir a obtenção deste produto em qualquer época do ano, onde controla-se a produção, independente da matéria prima, estação do ano, de condições ambientais, além disso, permite a utilização de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Assim este trabalho teve por objetivo a produção de carotenoides naturais por *Phaffia rhodozyma* Y-17268 em biorreator sistema semicontínuo empregando resíduos agroindustriais como substratos (água de maceração de milho- AMM, água de parboilização de arroz- APA e glicerol bruto). Na bioprodução avaliaram-se os parâmetros estequiométricos da bioprodução (produtividade de carotenoides e de célula, velocidade específica de crescimento e os fatores de conversão de glicerol, carbono e nitrogênio em carotenoides e célula). A produção foi realizada em biorreator com aeração de 1,5 vvm, 250 rpm, 25°C e pH inicial 4,0, por um período de 288 h em sistema semicontínuo, com cortes de 25, 50 e 75% a cada 96h de bioprodução. Observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) para *P. rhodozyma* foi de 0,067h⁻¹, produtividade em células (Px) máxima foi de 0,061g/L.h e a produtividade em carotenoides totais foi de 30,25 μ g/L.h. Desta forma, foi demonstrado que o sistema semicontínuo empregando matérias-primas agroindustriais é uma alternativa promissora para o aumento de escala da bioprodução de carotenoides.

Palavras-chave: Bioprodução, carotenoides, semicontínuo, resíduos agroindustriais.

1 INTRODUÇÃO

O interesse por carotenoides tem aumentado nos últimos anos, devido à crescente demanda destes compostos nas indústrias de alimentos (corantes e em suplementos nutricionais), farmacêutica, cosmética e de ração. O valor de mercado dos carotenoides alcançou US \$ 1,5 bilhão em 2017 e deve alcançar US \$ 2,0 bilhões até 2022, a uma taxa de crescimento anual de 5,7% para o período de 2017-2022 (BCC RESEARCH, 2018). Tal fato permitiu que houvesse grande interesse dos pesquisadores em descobrir novas fontes, processos e técnicas que pudessem ser empregadas para intensificar a produção destes pigmentos por micro-organismos. Os carotenoides obtidos pela síntese química envolvem um grande número de reações complexas, enquanto que estes mesmos carotenoides estão presentes naturalmente em microalgas, bactérias, leveduras e fungos (FÁBREGAS et al., 2001; HUI et al., 2007; BHOSALE et al., 2014; COLET et al., 2015; TSAI et al., 2016; CARDOSO et al., 2016; VALDUGA et al., 2008; URNAU, 2018).

A procura por compostos com conotação natural, tem resultado em um interesse científico e tecnológico referente à produção de carotenoides por via fermentativa. Nos últimos vinte anos as evidências científicas dão importância aos carotenoides não apenas pela ampla aplicação como corantes de alimentos e como precursores de vitamina A, mas também pelos efeitos benéficos para a saúde humana na diminuição de riscos de doenças degenerativas e fortalecimento do sistema imunológico. Entre as doenças contra as quais os carotenoides podem atuar estão os vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular (KRINSKY & JOHNSON, 2005; BOTELLA-PAVÍA & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; VÍLCHEZ et al., 2011; VENIL et al., 2013; SONG et al., 2016).

A produção de carotenoides por micro-organismos, apresenta algumas vantagens: os pigmentos sintetizados são considerados naturais; alguns micro-organismos são capazes de se desenvolver em substratos de baixo custo; é necessário pequeno espaço para a etapa de síntese; esta não se encontra sujeita às alterações climáticas e, para completar, as condições de cultivo podem ser manipuladas de forma a estimular a produção de um carotenoide específico. Desta forma, vários estudos estão direcionados a encontrar alternativas que possam induzir a síntese de carotenoides e/ou aumentar a eficiência destes sistemas biológicos de forma que eles sejam comercialmente viáveis (AUSICH, 1997; BHOSALE, 2004; COLET et al., 2015 e 2017; DIAS et al., 2015).

O desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de carotenoides visa um aumento do rendimento da concentração de carotenoide, assim como também a redução de custos relativos ao processo. Ressalta-se a possibilidade da utilização de subprodutos agrícolas de baixo custo e/ou resíduos, como matérias-primas, onde países em desenvolvimento podem investir neste campo de conhecimento, buscando competir neste mercado, principalmente o



Brasil, devido à sua imensa biodiversidade. Na literatura há relatos da utilização de substratos agroindustriais como o soro de queijo (AKSU & EREN, 2005; VALDUGA et al., 2009c), o mosto de uva (BUZZINI & MARTINI, 1999), derivados do processamento da cana-de-açúcar (VALDUGA et al., 2008; BARBATO, 2014), do processamento de milho (LOSS, 2009; VALDUGA et al., 2008) e glicerol da produção de biodiesel (SAENGE et al., 2011; VALDUGA et al., 2014; MACHADO & BURKERT, 2014; COLET et al., 2015; CARDOSO et al., 2016; URNAU, 2018).

Visando os benefícios dos carotenoides, regimes de condução (batelada, batelada alimentada e semicontínuo) são considerados eficientes e versáteis para a produção de carotenoides. Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio de bioprodução. Neste sentido, surge o sistema semicontínuo, no qual consiste em uma série de operações em sequência, onde coleta-se parte do meio fermentado (cortes da fermentação) em períodos sequenciais e adiciona-se ao reator um volume de meio de fermentação igual ao volume de meio fermentado retirado, onde o meio fermentado que permanece no biorreator serve de inóculo ao meio adicionado (SCHIMIDELL et al., 2007; FERREYRA et al., 2014; CALDEIRA, 2015). Porém, raros são os estudos empregando leveduras em sistema semicontínuo para a bioprodução de carotenoides, há relatos da produção de carotenoides pela levedura *Rhodospiridium toruloides* (DIAS et al., 2015) e *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 (COLET et al., 2017)

Neste contexto e frente às importantes aplicações dos carotenoides, surge a necessidade de estudos de processos que visam o aumento de escala e o aproveitamento dos constituintes do meio, bem como, técnicas que permitam manter a estabilidade dos biocompostos. Assim, justifica-se a importância da pesquisa sobre a bioprodução de carotenoides em biorreator, em sistema semicontínuo, utilizando co-produtos da indústria como substratos, a fim de aproveitar melhor os nutrientes do meio de bioprodução, bem como maximizar o rendimento dos compostos e reduzir custos de produção, esboçando-se estratégias para um possível aumento de escala e downstream de processo e além disso, avaliando seus efeitos antioxidantes naturais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo e bioprodução de carotenoides

A produção de carotenoides foi realizada com a levedura *Phaffia rhodozyma* Y-17268, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG-Universidade Federal de Rio Grande. Para o preparo do inóculo, uma alçada de células da cultura estoque foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM (Yeast Malt Extract): 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose. O meio foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min, e então, realizou-se a incubação em agitador orbital a 25°C, 180 rpm por aproximadamente 48 h.

A bioprodução em processo semicontínuo foi realizada em biorreator Biostat (de 2 L, 25°C, em ambiente com 1,2 lux, 250 rpm e 1,5 vvm de aeração), contendo inicialmente 100 mL de inóculo (25°C, 180 rpm, D.O~0,7 U.A) e 1 L de meio composto por misturas de subprodutos agroindustriais (100 g/L de AMM, 100 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA) por 96 horas. Os ensaios foram conduzidos por 288 h, realizando cortes de 25, 50 e 75 % a cada 96 h de bioprodução, totalizando assim 3 ciclos.

Recuperações de carotenoides

As amostras foram centrifugadas a 3.000x g, 5 °C por 10 minutos e realizada lavagem com álcool etílico e posterior lavagem com água destilada para remoção de resíduos de glicerol na célula. As mesmas foram congeladas em freezer a -80°C por 5 horas e secas em liofilizador por 36h.

Para o rompimento celular, à 0,05 g de células secas, foram adicionados 2 mL de dimetilsulfóxido – DMSO. As amostras foram submetidas a intervalos de 60 minutos de agitação a 180 rpm e aquecimento de 30°C em shaker.

Em seguida, adicionou-se 4 mL de acetona para extração dos pigmentos, seguido de centrifugações (3.000 g, 5 °C, 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células apresentem-se sem coloração. Nas fases solventes (sobrenadante) foram adicionados 10 mL da solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases foi realizado uma filtração com a adição de 2 g de sulfato de sódio e retirada a fase sobrenadante com o auxílio de uma pipeta.

Para a determinação de carotenoides, a absorbância da amostra após extração foi medida em espectrofotômetro. A concentração total de carotenoides foi estimada através do valor medido da máxima absorbância a 474 nm, utilizando a equação descrita por Davies (1976). O coeficiente de absorbância utilizado foi o referente a astaxantina: E 1% 1cm = 2100, para o solvente éter de petróleo (Silva et al., 2004).

Parâmetros Estequiométricos

A cada 24 horas foram obtidas amostras de cada ensaio para a determinação dos parâmetros estequiométricos. As taxas de crescimento microbiano (rx), a formação do produto (rp) e consumo de substrato (rs) podem ser determinadas



peelo balanço de massa para cada componente em um determinado momento, como apresentados nas equações 1, 2 e 3, respectivamente (Bailey e Ollis, 1986).

$$r_X = dX/dt \quad (1)$$

$$r_P = dP/dt \quad (2)$$

$$r_S = -dS/dt \quad (3)$$

A taxa específica de crescimento (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) podem ser obtidas dividindo as taxas instantâneas pela concentração de células, sendo expressas pelas Equações 3, 4 e 5, respectivamente (Bailey e Ollis, 1986).

$$\mu_x = r_X/X \quad (4)$$

$$\mu_p = r_P/X \quad (5)$$

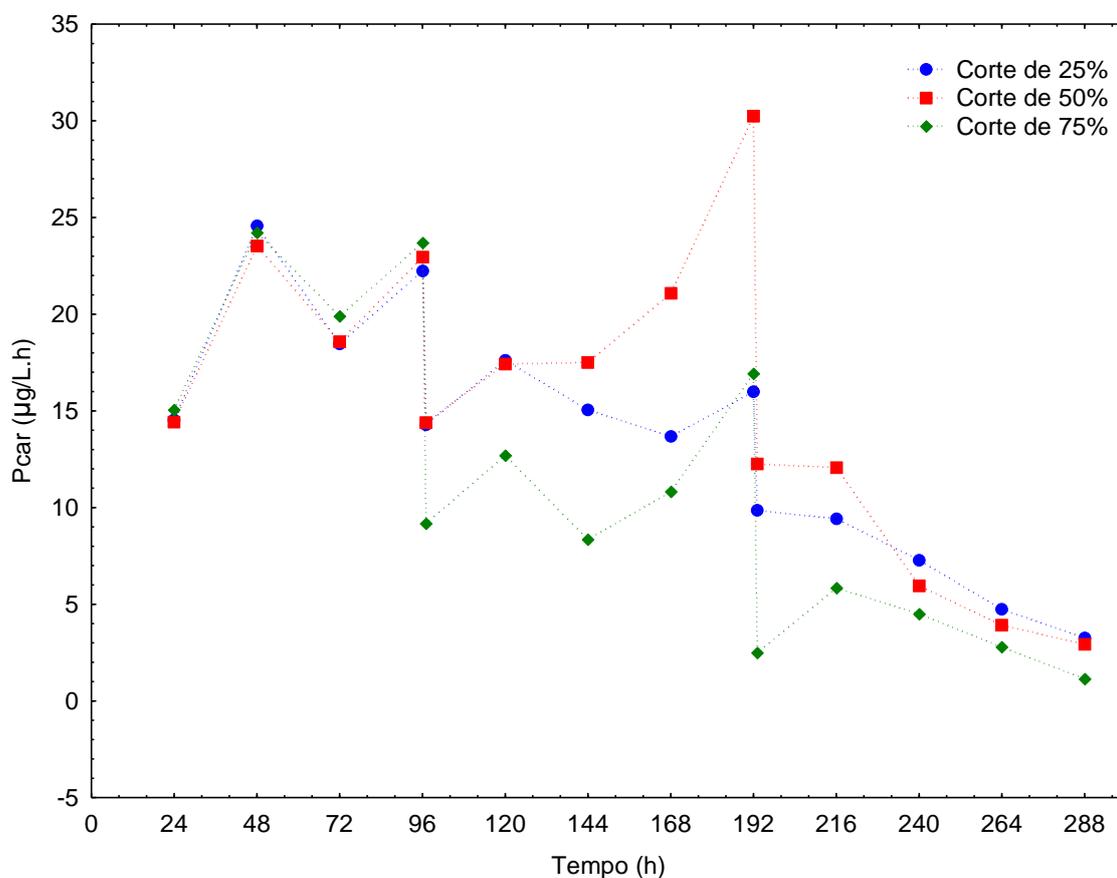
$$\mu_s = r_S/X \quad (6)$$

A produtividade global tanto em células como em carotenoides é definida, como as velocidades r_x e r_p descritas por Bailey e Ollis (1986).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a produtividade em carotenoides do processo semicontínuo com corte de 25%, 50% e 75% ao longo do cultivo. Observa-se que a maior produtividade foi de 30,25 $\mu\text{g/L.h}$ em 192 h com corte de 50% que foi similar com os outros cortes e 192h. Ao longo da bioprodução observa-se que com corte de 50% obteve-se uma maior produtividade se comparado aos outros ensaios. Após 216 h ocorreu um decréscimo constante na produtividade de carotenoides, obtendo-se um mínimo de 1,15 $\mu\text{g/L.h}$ com corte de 75% em 288 h de processo.

Figura 1 - Produtividade em carotenoides global (P_{car}) ao longo da bioprodução em processo semicontínuo com meio agroindustrial com corte de 25, 50 e 75%, a 1,5 vvm, 250 rpm, 25 °C, pH inicial 4,0 e 288 h.





Ao se comparar a produtividade de carotenoides em processo semicontínuo e batelada alimentada (URNAU et al., 2018) observou-se uma maior bioprodução de carotenoides, podendo ser explicado devido aos cortes terem ocorrido durante a fase exponencial do micro-organismo, podendo assim ter uma maior bioprodução com uma mesma quantidade de substrato (LOURENÇO, 2006).

O meio agroindustrial tem alto teor de alguns microelementos, como íons inorgânicos (MAIA, 2002), onde as leveduras exigem estes íons em concentrações tanto μM como mM para alcançar maiores aumentos de biomassa e rendimento em produto. Os microelementos têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente em função dos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas (STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

Deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais provocam alterações metabólicas significativas (SCHMIDT et al., 2011), resultando em um aumento na produção de biomassa. Mendes et al. (2013) comprovou estes dados com um estudo sobre o aumento da produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. A propagação realizada pelo processo semicontínuo foi mais eficiente do que o de batelada simples e a utilização de um meio agroindustrial suplementado com uma fonte proteica, tal como geralmente é realizado na propagação de leveduras para produção de cachaça de alambique, forneceu aumentos de biomassa e melhores parâmetros de propagação, quando comparado com um meio comercial.

Colet. et al (2017) utilizando a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* em bioprodução em processo semicontínuo com meio agroindustrial com corte de 50%, obteve a maior produtividade ($41,4\mu\text{g/L.h}$) em 48h de bioprodução.

Na Tabela 1 é apresentado os principais parâmetros obtidos para a *P. rhodozyma*, calculados para os dois cortes com 25%, 50% e 75% com a produção a base de resíduos agroindustriais.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de carotenoides por *P.rhodozyma* em biorreator dos ensaios em regime semicontínuo com meio agroindustrial.

Parâmetros	Valor máximo obtido	% Corte	Tempo de maior conversão (h)
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em glicerol)	822	50	193
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em glicerol)	0,91	50	193
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em COT)	11549	25	168
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em COT)	23,51	25	168
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em nitrogênio)	339026	25	216
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em nitrogênio)	530	50	216
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	1028	25	97
P_x (g/L.h)	0,061	50	48
μ_x (h^{-1})	0,067	50	24
P_{car} ($\mu\text{g/L.h}$)	30,25	50	192

Nestas condições, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para *P. rhodozyma* foi de $0,067\text{h}^{-1}$, produtividade em células (P_x) máxima foi de $0,061\text{g/L.h}$ e a produtividade em carotenoides totais foi de $30,25\mu\text{g/L.h}$. Estes valores são similares aos reportados em outros estudos realizados (VALDUGA et al., 2009-2014; COLET et al., 2015; COLET et al 2017; URNAU 2018).

Luna-flores et al. (2010) realizando produção de carotenoides de *X. dendrorhous* em batelada alimentada obteve um μ_{max} de $0,1258\text{h}^{-1}$ valor este superior ao obtido no presente trabalho.

Em processos fermentativos os fatores de conversão dificilmente serão constantes. Embora dependam do micro-organismo utilizado em relação a um determinado substrato, não dependem apenas disto, os demais componentes do meio também influenciam nestas conversões, assim como o tempo de agitação e a transferência de oxigênio no biorreator (SCHMIDELL et al; 2007).

De acordo com Liu & Wu (2006), em trabalho realizado com *P. rhodozyma* quando um aumento no rendimento específico de carotenoides é observado, há uma ampliação na biossíntese de carotenoides na célula da levedura. Comportamento esse que pode estar relacionado a mudanças no metabolismo e possível estresse celular. Além disso, Luna-Flores et al. (2010) relatam que, se $Y_{p/x}$ diminui ao longo da bioprodução, há um excesso de substrato no meio e menor proporção de células para conversão em produto final (carotenoides por *X. dendrorhous*), característica esta observada no presente estudo, onde no processo semicontínuo o $Y_{p/x}$ diminui após os cortes, isto se dá pelo aumento da quantidade de biomassa (células) característica resultante do processo semicontínuo com cortes no final da fase exponencial do micro-organismo, tendo o maior resultado em 96h. A maior conversão de célula em produto ($Y_{p/x}$) foi de $1028\mu\text{g/g}$ com um corte de 25%.



4 CONCLUSÃO

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *P. rhodozyma* em biorreator sistema semicontínuo com corte de 50% foi de 0,067 h⁻¹ com uma produtividade máxima em células de 0,061 g/L.h.

A utilização de glicerol, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz é uma alternativa viável para produção de carotenoides, principalmente por que o Brasil é rico nestes substratos, de baixo custo, ou seja, o uso de resíduos (coprodutos) além de tornar o processo menos dispendioso, apresenta-se como uma alternativa ao descarte inadequado desses coprodutos, visto que são ricos em material orgânico.

Diante do presente estudo apresentasse uma opção viável de produção de carotenoides, levando-se em consideração que o bioproduto gerado é considerado natural e pode ser aplicado em alimentos sem apresentar riscos à saúde do consumidor. Além disso, o uso de substratos de menor valor, torna a bioprodução aplicável.

5 AGRADECIMENTOS

À URI, FAPERGS e a CAPES pelo apoio financeiro e bolsas de estudos disponibilizadas para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- AKSU, Z.; EREN, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2985–2991, 2005.
- AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 2169-2173, 1997.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, McGraw- Hill Book Company, 2ed., p. 984, 1986.
- BARBATO, J. Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula* SP. em melão e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura. **Trabalho de conclusão de curso** em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, Paraná, 2014.
- BCC Research: The global market for carotenoids, <<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>> - Acessado em 02 jul. 2019.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 351-361, 2004.
- BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P.S. β -Carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 565-571, 2014.
- BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCION, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v.126, p. 369, 2006.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresources Technology**, v. 71, p. 41-44, 1999.
- CALDEIRA, J.P.R.A. Production of lipids (for biodiesel) and carotenoids from the yeast *Rhodotorula glutinis* grown in a bench reactor, in a fed-batch system. **Dissertação de Mestrado** de Microbiologia Aplicada, Universidade de Lisboa, 2015.
- CARDOSO, L.A.C.; JACKEL, S.; KARP, S.G.; FRAMBOISIER, X.; CHEVALOT, I.; MARC, I. Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 374-379, 2016.
- COLET, R.; DI LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Fed-batch production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636): kinetic and stoichiometric parameters. **European Food Research & Technology**, v. 240, p. 173-182, 2015.
- COLET, R.; URNAU, L.; BAMPI, J.; ZENI, J.; DIAS, B. B.; RODRIGUES, E.; JACQUES, R. A.; DI LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 11, p. 268-274, 2017.
- DIAS, C.; SOUSA, S.; CALDEIRA, J.; REIS, A.; SILVA, T. L. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 309-318, 2015.
- DAVIES, B. H; Carotenoid. In: Godwin, T. W. (ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plants and Pigments**, p. 138-165, Academic Press, New York, 1976.
- FÁBREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMÍNGUEZ, A. Two-stage cultures for production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 65-71, 2001
- FERREYRA, M.M.; SCHVAB, M.C.; DAVIES, C.V.; GERARD, L. M.; SOLDA, C.A. Obtención de vinagre de naranja en proceso semicontínuo, a escala laboratório. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, v. 25, n. 49, p. 154-165, 2014.



- HUI, N.I.; QI-HE, C.; HUI, R.; YUAN-FAN, Y.; LI-JUN, L.I.; GUANG-BIN, W.U.; YANG, H.U.; GUO-QING, H.E. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, p. 365-370, 2007.
- KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 459-516, 2005.
- LIU, Y.S.; WU, J.Y. 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.
- LOSS, E.M.S. Aproveitamento de resíduos da cadeia produtiva do milho para cultivo de cogumelos comestíveis. **Dissertação de Mestrado** em Ciências dos Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2009.
- LUNA-FLORES, C.H.; RAMÍREZ-CORDOVA, J.J.; PELAYO-ORTIZ, C.; FEMAT, R.; HERRERA-LÓPEZ, E.J. Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 131–136, 2010.
- LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, 2006.
- MACHADO, W.R.C.; BURKERT, J.F.M. Produção de carotenóides microbianos pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* utilizando coprodutos. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 6, n. 2, p. 59-69, 2014.
- MAIA, A.B.R.A. Equipamentos para a produção de cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 63-66, 2002.
- MENDES, T.A.O.; PINTO, L.M.; MENDES, D.S.O.; MALTA, H.L.; OLIVEIRA, E.S. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 81-89, 2013.
- SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROG, T.T.; BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210–218, 2011.
- SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R.J.; BERTOLA, N.C.; CONTREAS, E.M. **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Florianópolis: Ed. Tribo da Ilha, 2007.
- SCHMIDT, S.A.; DILLON, S.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P.A.; CHAMBERS, P.J. Impacts of variations in elemental nutrient concentration of Chardonnay musts on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation kinetics and wine composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 679-687, 2011.
- SONG, J.; LI, D.; HE, M.; CHEN, J.; LIU, C. Comparison of Carotenoid Composition in Immature and Mature Grains of Corn (*Zea Mays* L.) Varieties. **International Journal of Food Properties**, v.19, n. 2, p. 351-358, 2016.
- STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 115-120, 2004.
- TAI, H.; CHUANG, L.; CHEN, C.N. Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis* sp. DS3. **Food Chemistry**, v. 192, p. 682-690, 2016.
- URNAU, L.; COLET, R.; SOARES, V.F.; FRANCESCHI, E.; VALDUGA, E.; STEFFENS, C. Extraction of carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using ultrasound-assisted and chemical cell disruption methods. **Canadian journal of chemical engineering**, v. 96, p. 1377-1381, 2018.
- URNAU, L. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de carotenóides por *Phaffia rhodozyma* Y-17268 em biorreator batelada simples e alimentada. **Tese de doutorado**. Universidade Regional e Integral do Alto Uruguai e das Missões- Campus Erechim, 2018.
- VALDUGA, E.; VALERIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FURIGO JÚNIOR, A. Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1267-1274, 2008.
- VALDUGA, E.; VALERIO, A.; TREICHEL, H.; FURIGO JÚNIOR, A.; LUCCIO, M.D. Optimization of the bio-production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. **Food and Bioprocess Technology: An international Journal**, v. 2, p. 415-421, 2009a.
- VALDUGA, E.; VALERIO, A.; TATSCH, P.O.; TREICHEL, H.; FURIGO JÚNIOR, A.; DI LUCCIO, M. . Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p. 234-238, 2009b.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; VANZO, L.T.; RAUBER, F.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1060 - 1065, 2009c.
- VALDUGA, E.; RIBEIRO, A.H.R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 207-213, 2014.
- VENIL, C.K.; ZAKARIA, Z.A.; AHMAD, W.A. Review: Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemical**, v. 48, p. 1065–1079, 2013.
- VÍLCHEZ, C.; FORJÁN, E.; CUARESMA, M.; BÉDMAR, F.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 319-33, 2011.