

159762



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Aline Alves Barbosa da Silveira

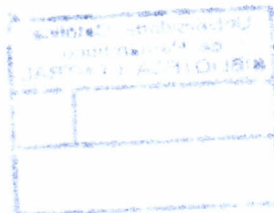
PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Mucor javanicus* (UCP 69), A PARTIR DE MEIO DEFINIDO E UTILIZANDO RESÍDUO INDUSTRIAL (MILHOCINA E QUIRERA DE MILHO)

Recife
2007

UNICAP - BIBLIOTECA CENTRAL



Aline Alves Barbosa da Silveira



PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Mucor javanicus* (UCP 69), UTILIZANDO MEIO DEFINIDO E RESÍDUO INDUSTRIAL (MILHOCINA E QUIRERA DE MILHO)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^a Dr^a Kaoru Okada

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Recife

2007



S587p

Silveira, Aline Alves Barbosa da

Produção de astaxantina por *Mucor javanicus* (UCP 69), a partir de meio definido e utilizando resíduo industrial (milhocina e quirera de milho) / Aline Alves Barbosa da Silveira ; orientador Kaoru Okada ; co-orientador Carlos Alberto Alves da Silva, 78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2007.

1. Carotenóides. 2. Astaxantina. 3. *Mucor javanicus*. 4. Resíduos industriais. 5. Milho – resíduos. 6. Milhocina I. Okada, Kaoru. II. Silva, Carlos Alberto Alves da. III. Produção de astaxantina por *Mucor javanicus* (UCP 69), a partir de meio definido e utilizando resíduo industrial (milhocina e quirera de milho).

CDU 576.8

Barbosa da Silveira, A. A. Produção de astaxantina por *mucor javanicus* (UCP 69), utilizando meio definido e resíduo industrial (milhocina e quirera de milho)

PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA POR *Mucor javanicus* (UCP 69), UTILIZANDO MEIO DEFINIDO E RESÍDUO INDUSTRIAL (MILHOCINA E QUIRERA DE MILHO)

Aline Alves Barbosa da Silveira

Examinadores:

Prof^a Dr^a Kaoru Okada (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a Dr^a Galba de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a Dr^a Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Barbosa da Silveira, A. A. Produção de astaxantina por *mucor javanicus* (UCP 69), utilizando meio definido e resíduo industrial (milhocina e quirera de milho)

Dedico

À minha mãe, Maria das Neves, ao meu esposo, Fábio e aos meus irmãos, Rosemere, Rejane, Robson e Antônio Cláudio por me apoiarem nos momentos difíceis e por sempre me incentivarem na busca pela felicidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela dádiva do saber, instrumento que nos impulsiona no caminho para desvendar os frutos de sua criação. A quem nos momentos difíceis recorri e sempre me iluminou e tornou tudo possível.

À CAPES, pela bolsa de Mestrado e pelo Intercâmbio UNICAP/UNICAMP realizado no segundo semestre de 2006.

Ao PROMATA e à FACEPE pelo financiamento do Projeto.

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Kaoru Okada e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, pelos ensinamentos dados durante todo o meu processo de aprendizado, neste e em outros trabalhos e à Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki, Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB/UNICAP e do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pelo apoio dado sempre que preciso.

Aos meus familiares, por entenderem o propósito das minhas rotineiras ausências em dados momentos.

Ao meu esposo Fábio, pelo incentivo e paciência, sempre do meu lado dando-me força para concluir esta jornada.

Em especial aos grandes amigos, Marcela Vieira, Ricardo Francisco da Silva, Renata Raimundo e Karla Costa que sem medir esforços sempre me apoiaram e também pela valiosa ajuda prestada na elaboração de experimentos agradeço a Rhadarane Magalhães e Jaceline Maria de Lima.

À Prof^a Dr^a Aline Elesbão pela ajuda em algumas análises.

Ao Prof. Dr. Valdemir Alexandre, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos funcionários do NPCIAMB, Sônia Maria de Souza, Humberto de Almeida e Salatiel Joaquim de Santana pela ajuda dispensada.

Aos amigos do Mestrado e do NPCIAMB/UNICAP.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao Reitor da UNICAP, PE Prof. Dr. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, SJ.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução	14
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
1.3 Revisão da Literatura	17
1.3.1 Carotenóides	17
1.3.1.1 Estrutura e nomenclatura	17
1.3.1.2 Fontes, propriedades e funções biológicas dos carotenóides.....	22
1.3.1.3 Biossíntese	25
1.3.1.4 Astaxantina	27
1.3.2 Organismos produtores de carotenóides	28
1.3.2.1 Carotenóides produzidos por fungos.....	30
1.3.2.2 Efeito da temperatura e pH na produção de carotenóides.....	31
1.3.2.3 Efeito da composição do meio na produção de carotenóides.....	33
1.3.4.3 Efeito da intensidade luminosa na produção de carotenóides	35
1.3.2.5 Utilização de fontes alternativas na produção de carotenóides	37

Barbosa da Silveira, A. A. Produção de astaxantina por *mucor javanicus* (UCP 69),
utilizando meio definido e resíduo industrial (milhocina e quirera de milho)

1.3.3 Aspectos industriais da produção de carotenóides	38
1.4 Referências Bibliográficas	41
CAPÍTULO II - Produção de astaxantina por <i>Mucor javanicus</i> (UCP- 69), a partir de meio definido e utilizando os resíduos industriais milhocina e quirera.....	54
CAPÍTULO III	
Conclusões gerais	76
ANEXOS.....	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura de carotenóides acíclicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)	20
Figura 2. Estrutura de carotenóides cíclicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)	21
Figura 3. Estrutura de carotenóides típicos de células animais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)	23
Figura 4. Espécies reativas de oxigênio (FONTANA, 2000)	24
Figura 5. Diagrama geral da via biossíntese de carotenóides (MARGALITH, 1999)	26

CAPÍTULO II

Figura 1. Valores simulados e experimentais da variável astaxantina produzida por culturas de <i>Mucor javanicus</i> submetidas a Leds azul	71
Figura 2. Valores simulados e experimentais da variável astaxantina produzida por culturas de <i>Mucor javanicus</i> crescidas na ausência de luz	71
Figura 3. Diagrama de Pareto da variável astaxantina, produzida por <i>Mucor javanicus</i> , submetida à iluminação com LED's azul	72
Figura 4. Diagrama de Pareto da variável astaxantina produzida por <i>Mucor javanicus</i> , na ausência de luz	72
Figura 5 Superfície de resposta de astaxantina produzida por culturas de <i>Mucor javanicus</i> submetidas à LED's azul	73
Figura 6 Superfície de contorno do modelo da variável resposta astaxantina em culturas de <i>Mucor javanicus</i> crescidas sob influência de LEDs azul	73

Barbosa da Silveira, A. A. Produção de astaxantina por *mucor javanicus* (UCP 69), utilizando meio definido e resíduo industrial (milhocina e quirera de milho)

Figura 7. Superfície de resposta de astaxantina em culturas de <i>Mucor javanicus</i> crescidas na ausência de luz	74
Figura 8 Superfície de contorno do modelo da variável resposta astaxantina em culturas de <i>Mucor javanicus</i> crescidas na ausência de luz	74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Nomenclatura comercial e semi-sistemática de carotenóides comuns.....	19
Tabela 2. Microrganismos produtores de carotenóides	28

CAPÍTULO II

Tabela 1. Resultados experimentais de produção da variável dependente astaxantina produzida por <i>Mucor javanicus</i> crescido no meio de cultura Hesseltine e Anderson	67
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 3 ³ utilizado para uma triagem de três fatores na produção de astaxantina por <i>Mucor javanicus</i> , para culturas iluminadas com Leds azul e sem iluminação.....	67
Tabela 3 Resultados experimentais de produção da variável dependente astaxantina produzida por <i>Mucor javanicus</i> a partir do planejamento 3 ³	68
Tabela 4. ANOVA para a variável resposta produção de astaxantina submetida à iluminação com LED's azul	69
Tabela 5. Coeficiente de regressão para a variável resposta produção de astaxantina submetida a iluminação com LED's azul	69
Tabela 6 ANOVA para a variável resposta produção de astaxantina produzida por <i>Mucor javanicus</i> crescido sem interferência de luz	70
Tabela 7. Coeficiente de regressão para a variável resposta produção de astaxantina sem interferência de luz.....	71

RESUMO

Com a recente substituição dos pigmentos sintéticos pelos carotenóides naturais, pesquisas têm sido desenvolvidas para viabilizar uma maior produção destas substâncias, através de fontes biológicas alternativas. Neste trabalho foi estudada a produção de astaxantina por uma amostra de *Mucor javanicus* utilizando o meio definido Hesseltine e Anderson (1957) modificado por Andrade (2000) e meios utilizando resíduos de milho (milhocina e quirera), em concentrações distintas (4%, 7% e 10%), pH 6,5, 120 rpm, 25°C. Foram analisada também a influência do tempo de cultivo da amostra durante 48h, 72h e 96h, na presença e ausência de luz azul. Ao término do processo fermentativo, a astaxantina foi extraída em solução de Hexano/metanol e analisada por espectroscopia UV- visível (470 nm). Todos os parâmetros estudados nos experimentos foram combinados através de um planejamento fatorial 3³ e analisados no Software Statística 5.0. No meio Hesseltine e Anderson o melhor rendimento de astaxantina foi verificado no tempo de 96h (26,7 µg/g), na ausência de luz e quando se utilizou luz azul (37,7 µg/g), obteve-se um aumento de 41%. A melhor condição para a produção da astaxantina com a milhocina deu-se na concentração de 4%, 96h, com luz (55,8 µg/g), aumentando em quase 100%, quando comparada com as culturas crescidas na ausência de luz (28,0 µg/g). A quirera na concentração de 7% apresentou melhor rendimento de astaxantina, no tempo de 96h, com luz (18,4 µg/g), aumentando 37%, quando comparada com as culturas crescidas na ausência de luz (13,4 µg/g). O melhor rendimento de astaxantina com milhocina e quirera deu-se na concentração de 7%, 96h, com luz (33,8 µg/g), aumentando em quase 47%, quando comparada com as culturas crescidas na ausência de luz (22,9 µg/g). As concentrações que mais favoreceram ao aumento do rendimento da astaxantina foram: milhocina 4%, quirera 4% e milhocina com quirera 7%, todos na presença de luz azul, demonstrando que a luz azul interfere diretamente na síntese de astaxantina. Bem como que os resíduos utilizados possuem potencial para a produção de astaxantina. As análises no Statística 5.0, demonstram a necessidade da realização de outros estudos para obtenção da produtividade máxima de astaxantina por *M. javanicus*, nos meios alternativos.

Palavras-Chave: Astaxantina, *Mucor javanicus*, Resíduos industriais, Resíduos de milho, Milhocina

ABSTRACT

With the recent substitution of synthetic pigments for the natural carotenoids, research has been effected in the direction to make possible the production of these substances through alternative considered biological sources. In this work was studied the production of astaxanthin for the sample of *Mucor javanicus* (CPU - 69), using the media definite Hesseltine and Anderson (1957) modified by Andrade (2000) and using different corn waste media (corn steep liquor –CSL and “quirera”) in three different concentrations (4, 7 and 10%), pH 6,5, 120 rpm, 25°C. It was analyzed, also, the influence of the time of culture of the sample (48h, 72h and 96 h) and the presence and absence of blue Light. To the ending of the fermentative process, the astaxanthin, was extracted in solution of Hexano/methanol (1: 1, v/v), centrifuged in 2000 rpm/10 minutes and analyzed by UV-visible spectrophotometry (470 nm). All the parameters studied in the experiments had been combined through a factorial design 3³ and analyzed in Software Statistica 5,0. With Hesseltine and Anderson the condition that more favored the increase of the income of the astaxanthin was with in the time of 96h (26,7 µg/g) in the absence of light and with the presence of light (37,7 µg/g) increase almost 41%. With CSL the best condition for the production of the astaxanthin was with in the time of 96h (55,8 µg/g) in the absence of light and with the presence of light (28,0 µg/g) increase almost 100%. The “quirera” in the concentration of 7%, presented astaxanthin income better, in the time of 96h, with light (18,4 µg/g) increase 37%, when compared with the cultures growth in the absence of light (13,4 µg/g). The best income of astaxanthin with CLS and “quirera” was in the concentration of 7%, 96h, with light (33,8 µg/g), increase almost 47% in when compared with the cultures growth in the absence of light (22,9 µg/g). The concentrations that more favored the income of astaxanthin was: CSL 4%, “quirera” 7% and CSL with “quirera” 7%, both in the presence of blue light, demonstrate the blue light intervenes directly with the astaxanthin synthesis. Also, the wastes utilizes have been potential for the astaxanthin production. The analyses in Statistica 5,0, demonstrate that other studies are necessary for attainment of the maximum productivity of astaxanthin for *M. javanicus*, in the wastes analyzed.

Key Words: Astaxanthin; *Mucor javanicus*; Industry waste; Corn waste; milhocina

Barbosa da Silveira, A. A. Produção de astaxantina por *mucor javanicus* (UCP 69),
utilizando meio definido e resíduo industrial (milhocina e quirera de milho)

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

O nome carotenóide provém do fato desta substância representar a maior parte dos pigmentos em cenouras (*Daucus carota*), e são, indubitavelmente, os mais difundidos e importantes pigmentos que ocorrem na natureza, dos quais mais de 600 formas já foram descritas e caracterizadas a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores, sendo também responsáveis, na maioria das vezes, pelas cores atraentes das flores e frutos (PFANDER, 1992; ZEB; MEHMOOD, 2004; UENOJO et al., 2007). São pigmentos insolúveis em água e suas estruturas químicas consistem em uma longa cadeia poliênica alifática formada pela condensação de unidades de isopreno sendo, por isso, também chamados de isoprenóides (BRAMLEY; MACKENZIE, 1992 apud ARORA et al., 1992). Entre os pigmentos, os carotenóides representam o mais importante e difundido grupo de Em crustáceos, como camarão e lagosta "in natura", o carotenóide astaxantina existe complexado com proteína, deixando o carotenóide mais estável, podendo estender para as cores azul, verde ou púrpura. Com tratamento térmico, por desnaturação da proteína é liberada a astaxantina e sua cor vermelha se revela (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993).

Carotenóides sintéticos têm sido empregados há muitos anos como corantes nas várias categorias industriais, principalmente, na indústria de alimentos e de medicamentos, mas, a procura por fontes biológicas alternativas tem sido preferida em relação aos produzidos por tecnologias químicas, devido à sua origem natural e à baixa absorção dos pigmentos sintéticos. Neste aspecto, merecem destaque, além dos diversos grupos de pigmentos extraídos de plantas e crustáceos àqueles sintetizados por um vasto grupo de microrganismos (KRINSKY, 1990; NELIS; DE LEENHER, 1991; FANG; CHENG, 1993).

A astaxantina é amplamente utilizada na aquicultura para conferir a coloração desejada em peixes, truta (*Truta truta*, *Truta fario*) e em especial no salmão (*Salmo salar*), para este fim, tem sido utilizado Krill e carapaças de camarão, lagosta e outros crustáceos, além de astaxantina sintética (FANG; CHENG, 1993; JOHNSON; AN, 1991; STOREBAKKEN; NO, 1992).

Entre os grupos de fungos produtores de carotenos, atenção especial tem sido dada aos *Zygomycetes*, pertencente ao Filo *Zygomycota* do Reino Fungi (ALEXOPOULUS et al., 1996). Dentro da referida classe, merecem destaque as espécies da ordem *Mucorales*, representados por um grupo de seres sapróbios, que utilizam matéria vegetal ou animal como substrato. As espécies de *Mucorales* têm sido amplamente explorados em processos biotecnológicos em função de seu rápido crescimento, reunindo características que despertam

grande interesse em virtude de sua importância na indústria e na horticultura (PELCZAR, 1997).

Conforme reportado por Fontana et al., (2000), dentre os carotenóides mais intensamente oxigenados, que podem ser obtidos por via microbiana, destacam-se a astaxantina (3,3'- dihidroxi - 4, 4'- diceto - β - caroteno), produzido industrialmente pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) e a cantaxantina (4-4'-diceto- β - caroteno), pigmento presente nas plumas do flamingo (*Phenicopterus ruber ruber*) e no "champignon" (*Cantharellus cinnaharinus*).

Meyer; Du Press (1993) apud Moriel (2005) descreveram que a astaxantina fúngica é produzida principalmente durante a fase exponencial, podendo também ser observada na fase estacionária, mas em pequena quantidade. Moriel (2004) apud Moriel (2005) descobriu que a concentração celular da astaxantina não varia após o término da fase exponencial e que não é necessário se chegar à fase estacionária para se obter a máxima concentração de astaxantina. A utilização de processos fermentativos em batelada para a produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* pode ser importante no aumento da biomassa e conseqüentemente, de astaxantina (MORIEL et al., 2005). A milhocina (CSL = Corn Steep Liquor) é um subproduto do processamento do milho, contendo 40% de sólidos totais e correspondendo à água de lavagem e embebição dos grãos, quando do fracionamento em amido, germe e óleo (FONTANA et al., 2000).

Neste trabalho, os fatores importantes para o crescimento do microrganismo e produção de pigmentos, tais como, composição e concentração dos substratos, tempo de cultivo e a presença de luz azul, foram alterados e combinados de acordo com planejamento fatorial completo para pesquisar a condição ótima de produção do carotenóide astaxantina a partir da espécie do fungo filamentosos *Mucor javanicus*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

➤ Investigar a produção de astaxantina a partir do *Mucor javanicus* (UCP 69), através da formulação de meio de cultura de baixo custo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar meios de cultura alternativos que propiciem uma boa produtividade de astaxantina;
- Estudar os parâmetros cinéticos da produção de astaxantina em escala laboratorial;
- Quantificar a astaxantina produzida;
- Analisar a produção de astaxantina através de modelos matemáticos.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Carotenóides

1.3.1.1 Estrutura e nomenclatura

Os carotenóides são notáveis pela sua larga distribuição, diversidade estrutural e várias funções, principalmente por conferirem cores amarela, laranja, vermelha ou roxa a algumas plantas ou animais e são, indubitavelmente, os mais difundidos e importantes pigmentos em organismos vivos (ZEB; MEHMOOD, 2004). Cerca de 600 carotenóides foram isolados de fontes naturais (PFANDER, 1992; ASTORG, 1997 apud FUENTE et al., 2006; ONG; TEE, 1992 apud ZEB; MEHMOOD, 2004).

As moléculas dos carotenóides são polienos isoprenóides ($C_{40}H_{56}$), constituídos por oito C_5 -isoprenos unidos, possuindo um esqueleto central com 22 átomos de carbono e 2 caudas com 9 carbonos cada um, resultando numa molécula simétrica (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004; FUENTE et al., 2006)

Os carotenóides pertencem as duas classes principais:

- i) carotenos: hidrocarbonetos cíclicos ou acíclicos (β -caroteno e licopeno);
- ii) xantofilas: carotenos oxigenados, com os grupos funcionais $-OH$ e $=O$; substituintes comuns do oxigênio com grupos hidroxil (como em β -criptoxantina), ceto (como em cantaxantina), epoxi (como em violaxantina) e aldeído (como em β -citraurina).

Carotenóides podem ser também acíclicos (ex. licopeno), monocíclicos (ex. γ -caroteno) ou dicíclico (ex. α - e β - caroteno). Em carotenóides naturais existem primeiramente a forma *all-trans* (ou *all-E*), mas em pequenas quantidades de *cis* (ou *Z*), podem ocorrer. (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; FUENTE et al., 2006).

Os carotenóides possuem uma nomenclatura semi-sistemática, no entanto, para facilitar são utilizados seus nomes triviais demonstrados na Tabela 1.

Na Figura 1 estão descritos alguns carotenóides acíclicos, dos quais, o licopeno é o mais comum. O licopeno é frequentemente encontrado em frutas e vegetais, tais como mamão e tomate (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A ciclização dos carotenóides (Figura 2) ocorre somente nas extremidades das cadeias carbônicas. O bicíclico β -caroteno é o mais freqüentemente encontrado dentre todos dessa classe de compostos, em alimentos como cenouras e mangas, seja em maior ou menor quantidade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo, ou seja, confere a habilidade de absorver luz na região do visível. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. Esse sistema também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). Devido à alta taxa de insaturação, fatores como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda na cor e na atividade pró-vitáminica. São também susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, dependendo da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, prooxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz (MALDONADE, 2003).

Tabela 1. Nomenclatura comercial e semi-sistemática de carotenóides comuns.

Nome trivial	Nome sistemático
Aleuraxantina	1', 16'-Didesidro-1', 2'-dihidro- β , ϕ - caroten- 21- ol
Astaxantina	3,3'- dihidroxi – 4,4'- diceto - β -caroteno
Cantaxantina	4,4'- Diceto - β -caroteno
α -Caroteno	β , ϵ -Caroteno
β -Caroteno	β , β -Caroteno
γ -Caroteno	β , ϕ -Caroteno
ϵ -Caroteno	ϵ , ϕ -Caroteno
δ -Caroteno	7,8,7', 8'- Tetrahidro- β , β -caroteno
β -Criptoxantina	3 -Hidroxi, β , β -caroteno
3,4-Didesidrolícopeno	3,4-Didesidro- ϕ , ϕ -caroteno
Equinenona	β , β -Caroten-4-ona
Lícopeno	ϕ , ϕ -Caroteno
Lícoperseno	7,8,11,12,15,7', 8', 11', 12', 15'- Decahidro- ϕ , ϕ -caroteno
Neurosporaxantina	Ácido 4' - Apo- β - caroten- 4' - óico
Neurosporeno	7,8-Dihidro- ϕ , ϕ -caroteno
Filipsiaxantina	1,1'-Dihidroxi-3,4,3',4'-tetradesidro-1,2,1',2'-tetrahidro- ϕ , ϕ -caroteno-2,2'-diona
Fenicoxantina	3-hidroxi- β , β -Caroten-4,4'- diona
Fitoeno	7,8,11,12,15,7',8',11',12'- Octahidro - ϕ , ϕ -Caroteno
Fitoflueno	7,8,11,12,7',8'- hexahidro - ϕ , ϕ -Caroteno
Plectianaxantina	3',4'- Didesidro-1',2'-dihidro - β , ϕ -Caroteno-1',2'-diol
Rodoxantina	4', 5'- Didesidro – 4,5'- retro- β , β -Caroteno-3,3'-diona
Rubixantina	β , ϕ -Caroten-3-ol
7,8,11,12-Tetrahidrolícopeno	7,8,11,12-Tetrahidro- ϕ , ϕ -Caroteno
Torularodina	Ácido 3',4'-Didesidro- β , ϕ -caroten-16'-óico
Toruleno	3', 4'-Didesidro- β , ϕ -caroteno
α -Zeacaroteno	7', 8'-Dihidro- ϵ , ϕ -Caroteno
β -Zeacaroteno	7', 8'-Dihidro- β , ϕ -Caroteno
Zeaxantina	β , β -Caroteno-3,3'-diol

Fonte: Rodriguez-Amaya (2001).

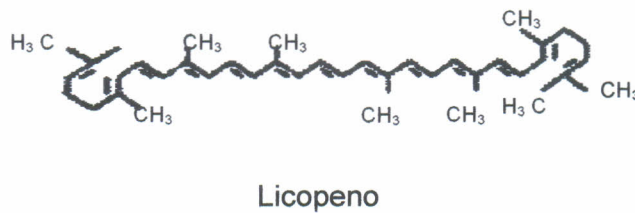
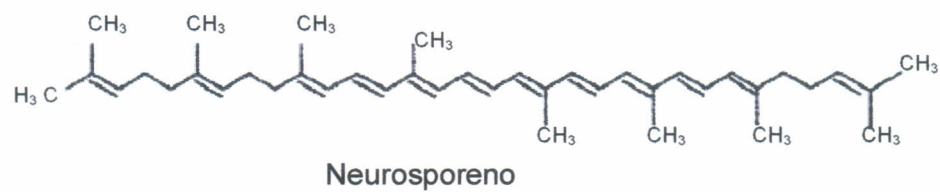
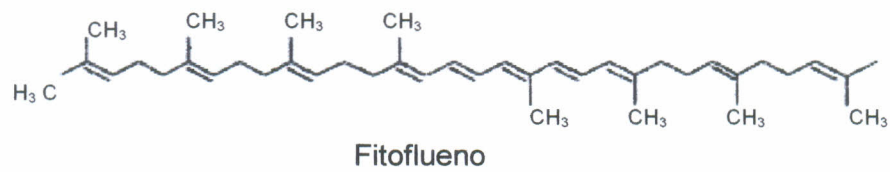
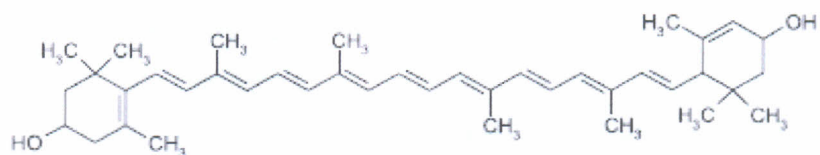
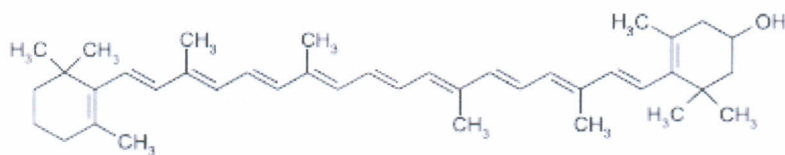


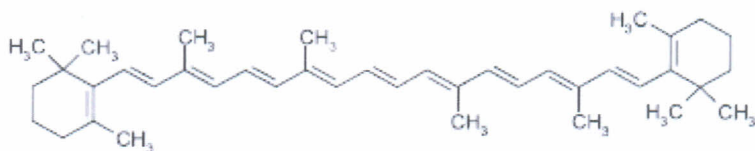
Figura1. Estrutura de carotenóides acíclicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)



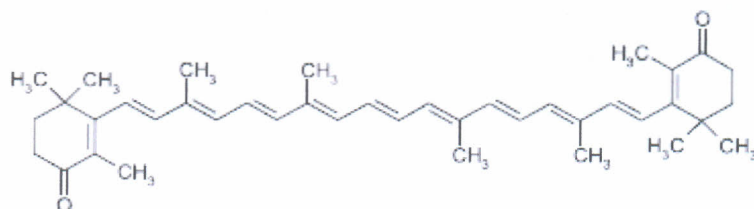
Luteína



Criptoxantina



β-Caroteno



Cantaxantina

Figura 2 Estrutura de carotenóides cíclicos
(RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)

1.3.1.2 Fontes, propriedades e funções biológicas dos carotenóides

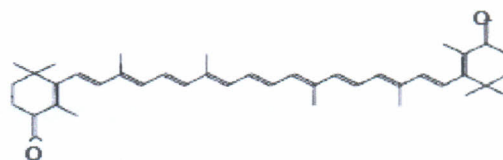
Os carotenóides possuem muitas variedades na distribuição da natureza, estrutura e funções. As funções primárias dos carotenóides em organismos fotossintetizantes são a de assessorar a captação de pigmentos. Diversas plantas podem biossintetizar alguns carotenóides, onde, freqüentemente as cores brilhantes dos carotenóides são encobertas pelos pigmentos clorofilicos, como por exemplo, em vegetais e folhas verdes (ZEB; MEHMOOD, 2004). Em um grande número de plantas maduras a clorofila presente decresce deixando os carotenóides responsáveis pela beleza das cores de muitos frutos (abacaxi, laranjas, uvas, morangos, tomates, entre outros) e muitas flores (*Eschscholtzia*, *Narcissus*) (MANGELS et al., 1993 apud ZEB; MEHMOOD, 2004).

Os animais são incapazes de realizar sua biossíntese, limitando-se apenas, a partir da dieta, nos tecidos, sem modificação ou ligeiramente modificada por reações de oxidação, produzindo assim carotenóides típicos de animais, tais como cantaxantina, equinenona, tunaxantina e astaxantina, representados na Figura 3. Alguns dos animais que possuem estes carotenos são os pássaros, como o flamingo e o canário, certos insetos e animais marinhos (GOODWIN; JAMIKORN, 1954 apud MALDONADE, 2003; MANGELS et al., 1993 apud ZEB; MEHMOOD, 2004).

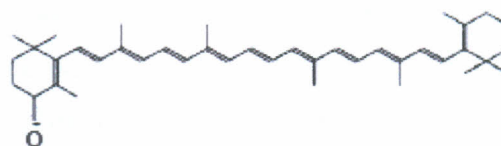
A cor dos salmonídeos é um importante critério de qualidade. A típica cor vermelha rosada dos músculos dos salmonídeos se deve à astaxantina, carotenóide não sintetizado pelos peixes, adquirido a partir da dieta, principalmente a base de crustáceos e zooplânctons. (CHOUBERT, et al., 2006).

A astaxantina é o carotenóide principal em zooplânctons, segundo van der Meeren (2001) apud Moren et al., 2002. A tunaxantina é o carotenóide mais encontrado em peixes (DI MASCIO et al., 1989, RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

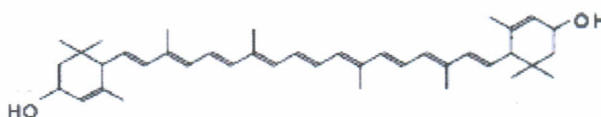
Ronestad et al., (1998) apud Moren et al., (2002), reportaram muitas diferenças entre a composição dos carotenóides em *Artemias* e zooplânctons. Os zooplânctons contêm muita astaxantina e luteína enquanto que as *Artemias* contêm criptoxantina e cantaxantina.



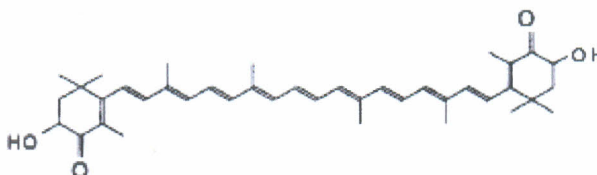
Cantaxantina



Equinenona



Tunaxantina



Astaxantina

Figura 3. Estrutura de carotenóides típicos de células animais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001)

Em seres humanos, os carotenóides possuem importantes funções, Estão entre os mais importantes e eficientes combatentes dos radicais livres, fortalecimento do sistema imunológico e diminuição do risco às doenças degenerativas como cânceres, cardiovasculares, degeneração macular e formação de cataratas, prevenindo diversas doenças crônicas nos homens (JOHNSON; SCHROEDER, 1995; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

A função biológica mais pesquisada e conhecida em seu papel nutricional é o de atividade precursora de vitamina A, que possui muitas funções aos sistemas vitais e é fornecida através da dieta como pró-vitamina A, proveniente de alimentos de origem animal (fígado, ovos, peixes, leites e carnes) ou como carotenóides que podem ser biologicamente transformados em vitamina A, como o β -caroteno, β -criptoxantina, criptoxantina, luteína, astaxantina (em alguns peixes), zeaxantina, geralmente provenientes de alimentos vegetais. Estima-se que 60% da vitamina A da dieta provenha da pró-vitamina A (GROSS; BUDOWSKI, 1966 apud MOREN et al., 2002; SIMPSON et al., 1971 apud ANDRADE, 2003). A deficiência desta vitamina é a maior causa de mortes pré-maturas em nações em desenvolvimento, particularmente entre crianças (BRITTON et al., 1992; apud ZEB-MEHMOOD, 2004; PATTON et al 1990; IBRAHIM et al., 1991 apud ZEB; MEHMOOD, 2004; MOREN et al., 2002).

Estes efeitos benéficos à saúde são independentes da atividade pró-vitamina A e têm sido relacionados às propriedades antioxidantes dos carotenóides na desativação de radicais livres e a sua capacidade de retirar o oxigênio livre, ligado a um sistema de ligações duplas conjugadas, sendo que a máxima proteção descrita é obtida quando se utilizam carotenóides com nove ou mais dessas ligações duplas (MORTENSEN et al., 1997, 2001). O licopeno, carotenóide acíclico, foi observado como mais efetivo que o β -caroteno, bicíclico (DI MASCIO et al., 1989; WOODALL et al., 1997; GUTERIDGE; HALIWELL, 2000).

Um exemplo notável é a capacidade 250 vezes superior da astaxantina em combater radicais livres (espécies ativas de oxigênio) quando comparado com o α -tocoferol (FONTANA et al 2000; NAGUIB et al., 2000). A ocorrência de radicais livres refere-se ao oxigênio livre ($^1\text{O}_2$) e às ditas espécies reativas do oxigênio ou ERO(s) (Figura 4).

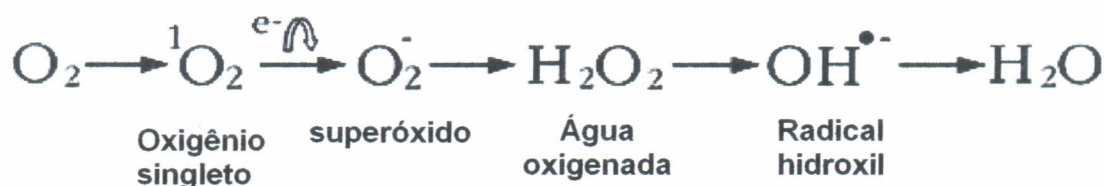


Figura 4. Espécies reativas de oxigênio (FONTANA et al., 2000).

Estes ERO(s) são gerados no percurso normal do metabolismo do oxigênio, mas podem ser intensificados após a exposição à xenobióticos (ex.: pesticidas). Como efetores maléficos clivam o DNA, peroxidam lipídios insaturados, alteram a atividade enzimática e despolimerizam alguns polissacarídeos. O efeito provocado é o envelhecimento e consequentemente, a morte celular. Diversos compostos naturais ricos em ligações duplas conjugadas atuam, por seu efeito antioxidante, na destruição destes radicais livres, sendo exatamente o efeito mais benéfico que os carotenóides proporcionam na dieta ou de formulações medicamentosas, desempenhando assim no organismo humano ou no animal, em geral, a liberação e a extinção de diversos radicais livres (FONTANA et al., 2000).

1.3.1.3 Biossíntese

Os carotenóides são sintetizados somente pelas plantas e microrganismos e sua biossíntese em plantas tem sido estudada há mais de 50 anos. A primeira etapa da biossíntese do carotenóide envolve a formação de geranyl-geranyl 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, contudo, 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 (ZEB; MEHMOOD, 2004).

A biossíntese de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) pode ocorrer de duas maneiras. Em ambas as vias ocorre 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 de ocorrer a oxidação do segundo C-4 do outro anel do 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 -caroteno-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. Em contraste aos *Haematococcus pluvialis* e *Agrobacterium aurantiacum*, nem a cantaxantina (β, β -caroteno, 4, 4'-diona) nem a zeaxantina foram encontrados em *X. dendrorhous*, nos meios de cultivos estudados (ANDREWS et al., 1976;

JOHNSON, et al., 1980 apud MALDONADE, 2003). Trabalhos recentes em relação à biossíntese envolvem a manipulação genética de microrganismos (MISAWA et al., 1990; MISAWA et al., 1995).

A figura 5 apresenta um diagrama proposto para a biossíntese de carotenóides (MARGALITH, 1999). A biossíntese até fitoeno pode ser dividida em três etapas: a) a formação de isopentenil pirofosfato (IPP), b) conversão de IPP para geranil pirofosfato (GGPP), e c) a condensação de duas moléculas de GGPP para formar fitoeno, o qual é o precursor da maioria dos carotenóides (BRAMLEY, 1993).

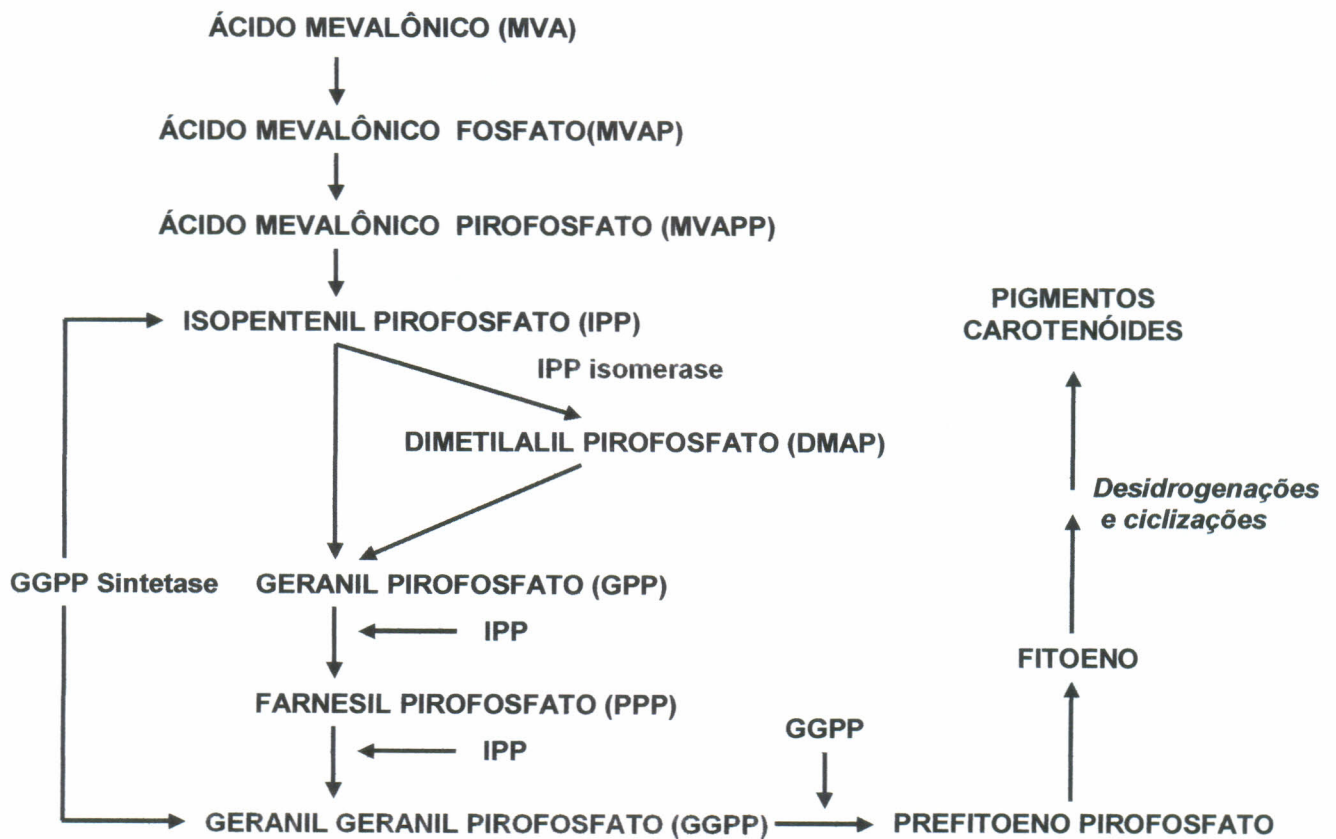


Figura 5. Diagrama geral da via biossíntese de carotenóides (MARGALITH, 1999)

1.3.1.4 Astaxantina

A astaxantina é o carotenóide de maior valor econômico e tem tido considerável sucesso comercial, principalmente como colorante de salmão e truta na aquicultura (LORENZ; CYSEWSKI, 2000 apud LABABPOUR, 2003).

A astaxantina (3,3'- dihidroxi -4,4'-diceto- β - caroteno) é um pigmento cetocarotenóide vermelho que teve seu interesse aumentado nos últimos anos, na indústria de cosmético e de alimento, como um colorante para a criação de peixes e aves domésticas. É um forte agente colorante e possui propriedades antioxidantes cerca de 10 vezes maior que outros carotenóides, como zeaxantina, luteína, cantaxantina e β -caroteno e 500 vezes maior que α -tocoferol. Dentre as propriedades benéficas da astaxantina destaca-se a ação curativa para muitos problemas de saúde e por seqüestrar o oxigênio singlete; redução significativa de riscos de infarto; imunomodulador na indústria farmacêutica; fonte de vitaminas para a indústria de aves domésticas; conservante natural; aditivo e antioxidante na indústria de alimentos e precursor de vitamina A, em certas espécies de peixes. Possui potencial curativo para muitos problemas de saúde, como na prevenção do câncer (JOHNSON; AN, 1991; LORENZ; CYSEWSKI, 2000 apud LABABPOUR, 2003; GUERIN et al., 2003 apud SUTH et al., 2006; KIM, et al., 2006; GROSS; LOCKWOOD, 2004).

A astaxantina é ubíqua na natureza, especialmente em ambientes marinhos, sendo responsável pela cor vermelho rosada dos músculos de salmão, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), alguns crustáceos como o camarão, lagosta, lagostim e caranguejos. Por esses animais serem inábeis de sintetizar astaxantina "de novo", os pigmentos carotenóides são suplementados na dieta. Em camarão e lagosta "in natura", a astaxantina existe complexada com proteína. Essa complexação permite uma maior estabilidade, permitindo assim a presença de coloração azul, verde ou púrpura. Com tratamento térmico, ocorre a desnaturação da proteína, que libera a astaxantina, com uma cor vermelha. *Haematococcus pluvialis* é considerado o mais promissor produtor de astaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; CHOUBERT, et al., 2005; Kim, Z. et al., 2006).

A astaxantina pode ser extraída de fontes naturais ou sintetizada quimicamente, no entanto, a síntese química é conhecida por conter carotenóides desnaturados que não são tão eficientes como os produzidos naturalmente (GONG; CHEN, 1998 apud ANDRADE, 2003; JOHNSON; AN; 1991). Conseqüentemente, houve um aumento do interesse na produção de astaxantina, principalmente por via biotecnológica, através de microrganismos como algumas leveduras e microalgas, sendo *Haematococcus pluvialis* considerada a mais promissora (CHOUBERT et al., 2005; KIM et al., 2006; KAEWPINTONG, et al., 2006).

A produtividade e rendimento da astaxantina também pode ser melhorada através da otimização da concentração de acetato, salinidade e idade da cultura adequados, porém a construção de um modelo experimental contendo estes termos, é muito complexa (SARADA et al., 2002).

1.3.2 Organismos produtores de carotenóides

Apesar de existirem muitos microrganismos produtores de carotenóides, apenas alguns são biotecnologicamente interessantes, destacando-se a produção de beta-caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora*, microalga marinha *Dunaliella*, microalga de água doce *Haematococcus* sp. e pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Contudo com *Blakeslea trispora*, a produção de caroteno pode ser estimulada para usos em aplicações comerciais lucrativas, sendo a maioria desses microrganismos utilizados como sistema de modelo de estudo favorável para a fotorregulação, biossíntese e a influência de modificações genéticas nos microrganismos. (TADA; SHIROISH, 1982; LAMPILA et al., 1985; JOHNSON; SCHROEDER, 1995). Na tabela 2, estão descritos alguns carotenóides produzidos por microrganismos.

Dentre as bactérias, apenas as halobactérias e arqueobactérias são conhecidas por produzirem carotenóides, ressaltando-se a cor vermelha brilhante das células em suspensão das halobactérias (ex. *Halobacterium* e outras espécies halotolerantes de arqueobactérias), se deve aos carotenóides (JOHNSON; SCHROEDER, 1995).

Muitos microrganismos não fotossintetizantes produzem traços de pigmentos carotenóides quando crescidos no escuro. Mas, uma breve exposição à luz, resulta em uma síntese substancial de carotenóides (TADA; SHIROISH, 1982).

A alga verde *Haematococcus pluvialis* é uma fonte biológica em potencial para a produção de astaxantina (JOHNSON; AN, 1991).

Tabela 2 Microrganismos produtores de carotenóides

Organismos	Espécies	Carotenóides principais
Cianobactérias	<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 -caroten-3,3'-diol)
	<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
	<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína
Fungos filamentosos e leveduras	<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno
	<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina
	<i>Rhodotorula</i> sp.	Toruleno e β -caroteno
	<i>Rhodospiridium</i> sp.	Toruleno e β -caroteno
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Toruleno e torularrodina (3',4'-didehidro- β,ϕ -caroten-16'-óico)
Bactérias	<i>Brevibacterium</i> sp.	Cantaxantina e astaxantina
	<i>Deinococcus</i> sp.	Derivados 4-ceto do γ - caroteno
	<i>Flavobacterium</i> sp.	Zeaxantina e β -caroteno
	<i>Mycobacterium brevicaie</i>	Cantaxantina
	<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina
	<i>Mycobacterium phlei</i>	Xantofilas e β -caroteno
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Derivados 4-ceto do γ - caroteno
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rodoxantina (4',5'- didehidro-4,5'-retro- β,β -caroten-3,3'-diona)
	<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas	

Fonte: Johson; Schoroeder (1995) (Adaptado).

1.3.2.1 Carotenóides produzidos por fungos

O Reino Fungi, baseado em características morfológicas e produtivas inclui, atualmente, quatro filos (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota). A fase vegetativa se apresenta como duas unidades morfológicas básicas, a leveduriforme e filamentosa. As células únicas, delimitadas e pequenas, são denominadas leveduriforme ao contrário das hifas que são células extremamente polarizadas, na forma de tubos, que se estendem, continuamente, em suas extremidades e seu conjunto é denominado de micélio. Algumas espécies, tais como as do gênero *Mucor*, apresentam a capacidade de alternar entre a fase micelial e leveduriforme, fenômeno denominado de dimorfismo. Tais alterações podem ser causadas por variações na composição dos nutrientes, temperatura e/ou aeração (GRIFFIN, 1994 apud LOGUERCIO-LEITE et al., 2006; SIEVERS et al., 1999 apud LOGUERCIO-LEITE et al., 2006; LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

A grande capacidade que as leveduras possuem de crescer em vários substratos como resíduos de alfafa (OKAGBUE; LEWIS, 1984 apud MALDONADE 2003), melaço (HAARD, 1988 apud MALDONADE, 2003), pasta de leveduras e hidrolisados protéicos, torna-as microrganismos promissores para a produção de carotenóides. Porém, as leveduras utilizadas atualmente nas indústrias, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces* e *Candida utilis*, não produzem carotenóides.

A descoberta da *Phaffia* em meados da década de 60 e a elucidação das estruturas químicas dos pigmentos fez com que o interesse em produzir carotenóides por leveduras aumentasse. As principais leveduras estudadas para a produção de carotenóides são *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Rhodotorula* sp., que se destacam pela alta concentração de astaxantina e toruleno, respectivamente. Recentemente, devido às modernas técnicas de biologia molecular, *Phaffia rhodozyma* foi reclassificada e renomeada como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (MALDONADE, 2003).

A concentração total de carotenóides das linhagens selvagens de leveduras do gênero *Rhodotorula*, em geral, varia de 10 a 100 µg/g de biomassa seca, sendo o toruleno, a torularrodina e o β - caroteno os principais carotenóides deste gênero, dependendo das condições de cultivo. Devido a um alto crescimento celular em curto tempo, as linhagens de *Rhodotorula* são uma boa alternativa como fonte de proteína, na preparação de ração para aves e peixes (PERRIER et al., 1995 apud MALDONADE, 2003).

Entre os grupos de fungos produtores de carotenos, atenção especial tem sido dada aos *Zygomycetes*, Classe pertencente ao Filo *Zygomycota* (ALEXOPOULUS et al., 1996). Dentro da referida classe, merecem destaque os *Mucorales*, representados por um grupo de

seres sapróbios que utilizam matéria vegetal ou animal como substrato.

Os *Mucorales* têm sido exaustivamente explorados em processos biotecnológicos em função de seu rápido crescimento, reunindo organismos que despertam grandes interesses em virtude de sua importância na indústria e na horticultura (PELCZAR, 1996).

Devido a morfologia, as leveduras são preferidas na fermentação industrial porque permite o crescimento em culturas submersas. A quantidade de biomassa produzida é grande e as células são facilmente separadas do meio de cultura; além disso, as leveduras crescem a 30°C; Técnicas clássicas são bem estabelecidas em *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleeanus*, no entanto, é difícil aplicar técnicas moleculares para esses fungos, por causa da falta de um sistema de transformação eficiente e habilidade de expressar genes exógenos, tornam o *Mucor circinelloides* mais receptivo para técnicas moleculares em comparação com outros *Zygomycetes* tradicionalmente utilizados (FRASER et al., 1996 apud ANDRADE, 2003)

Pesquisas realizadas com mutantes de *Mucor circinelloides* constataram que o aparecimento de carotenóides ocorre na fase estacionária e com uma produção máxima depois de 3 dias em culturas típicas de *Mucor circinelloides*, mas em 4 dias em espécies deficientes em carotenóides. Com esse perfil de acumulação de carotenóides, os autores concluíram que os carotenóides são metabólitos secundários em *Mucor circinelloides* (FRASER et al., 1996 apud ANDRADE, 2003).

Recentemente, Andrade (2003) descreveu o processo de otimização da astaxantina pelo fungo *Mucor Javanicus*, avaliando a influência de fatores físicos, como a temperatura e químicos como o tipo de fonte de carbono, através de planejamento fracionário completo.

1.3.2.2 Efeito da temperatura e pH na produção de carotenóides

A temperatura e pH exercem grande influência no crescimento microbiano, metabolismo e na viabilidade celular. As concentrações enzimáticas de β -caroteno sintetase e toruleno sintetase são afetadas pela temperatura (HAYMAN et al., 1974 apud MALDONADE, 2003). De acordo com Goodwin (1980) apud Maldonade (2003), linhagens de *Rhodotorula* sp. podem ser cultivadas em meios fermentativos na faixa de temperatura variando de 5 a 26°C.

A concentração relativa de cada pigmento em relação à concentração de carotenóides totais foi alterada pela temperatura do processo, quando *Rhodotorula glutinis*-22P foi cultivada a 5°C e 25°C. *Rhodotorula* sp. produziu predominantemente β -caroteno em temperaturas baixas e, sintetizou toruleno e torularrodina em temperaturas mais elevadas. Entretanto, o

crescimento ótimo de *R. glutinis*- 22P foi a 30°C (FRENGOVA et al., 1994 apud MALDONADE, 2003).

O pH inicial teve um grande efeito no crescimento da levedura *Rhodotorula rubra*, assim como na produção de carotenóides (SHIH; HANG, 1996 apud MALDONADE, 2003). Em pH baixos, na faixa de 3,4 a 4,5, houve inibição do crescimento celular e da produção de carotenóides. A máxima produção celular e de pigmentos ocorreu a pH inicial de 5,0.

A co-fermentação por *Rhodotorula glutinis* 22P e *Lactobacillus helveticus* 12A foi estudada por Frengova et al., (1995) apud Maldonade (2003) para aumentar a produção de carotenóides, tais como β -caroteno, toruleno e torularrodina. A máxima produção foi de 31,9 g/L para células e de 8,388 μ g/L para carotenóides, quando cultivados a 30°C em meio contendo lactose como fonte de carbono. Os autores observaram que a temperatura de fermentação de ambas as culturas influenciava a carotenogênese da levedura, alterando as proporções relativas dos carotenóides formados.

Martin et al., (1993) apud Maldonade (2003) determinaram os parâmetros de crescimento e produção de carotenóides por *Rhodotorula rubra*. As condições ótimas de crescimento foram: glicose (1,5 g/L), pH (5,5), temperatura de 22°C e cultivo sob agitação de 200 rpm durante 4 dias para obtenção de 4,8 g/L de biomassa seca.

Tada; Shiroishi (1982) descreveram que o efeito da temperatura na fotorregulação na carotenogênese está relacionado à intensidade da luz. Segundo os autores, a concentração de carotenóide produzido e a taxa de crescimento de *Rhodotorula minuta* sob iluminação contínua, foram apenas relacionados à reação fotoquímica.

A influência do pH, temperatura e concentração do substrato na fermentação de *Xanthophyllomyces dendrorhous* foram avaliados por Fang; Chiou (1993) apud Maldonade (2003). A temperatura ótima de crescimento celular e produção de carotenóides foi de 15°C em pH inicial de 5,0, obtendo-se 4,9 g de massa celular. Também foi neste valor de pH onde foram observados os maiores valores de rendimento celular ($Y_{x/s}$) e de astaxantina ($Y_{p/s}$), com 1.894,1 μ g/g de células secas e 574,3 μ g/g de açúcar consumido, respectivamente. Entretanto, Johnson; Gil-Hwan (1995) apud Maldonade (2003) haviam reportado que a temperatura ótima de crescimento e de produção de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous* ficou entre 20 e 22°C.

Johnson et al., (1980) apud Maldonade (2003) verificaram que as condições ótimas para a produção de carotenóides não são as mesmas para o crescimento celular. O pH ótimo de crescimento para *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi determinado como 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina foi no pH 5,0.

1.3.2.3 Efeito da composição do meio na produção de carotenóides

Em geral, os valores máximos de carotenóides totais não estão diretamente correlacionados aos valores máximos da biomassa celular, sendo que a máxima produção de carotenóides observada por Fang; Chiou (1993) apud Maldonade (2003) ocorreu depois de 3 horas de fermentação, enquanto o crescimento celular máximo ocorreu após 25 horas.

As linhagens das leveduras do gênero *Rhodotorula* são oleaginosas (RATLEDGE, 1981), assim, altas taxas de C/C aumentam a biossíntese de lipídeos. Martin et al., (1993) apud Maldonade (2003) obtiveram 5,7% de lipídeos da biomassa de *Rhodotorula rubra*, valor inferior ao de 7% observado por Moo-Young et al., (1979) apud Maldonade, 2003. Linhagens de *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivadas em meio com limitação de nitrogênio, resultaram em uma diminuição da concentração de astaxantina. Provavelmente isso aconteceu porque o substrato comum, acetil-coenzima-a, foi deslocado da biossíntese de carotenóides para formação de lipídeos, devido à alta relação C/N.

Fontes de nitrogênio também afetam o crescimento e a pigmentação em *Xanthophyllomyces dendrorhous*. A peptona foi considerada melhor fonte de nitrogênio para pigmentação, entretanto, estudos relataram que o uso do extrato de leveduras como fonte de nitrogênio aumentou a concentração de carotenóides totais (MEYER; Du PREEZ, 1994b apud MALDONADE, 2003; CALO et al., (1995a) apud MALDONADE, 2003). An et al., (1991) apud Maldonade (2003) observaram que a fonte de nitrogênio é lentamente absorvida pelas linhagens mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, indicando que a biossíntese de astaxantina pode ser regulada pelo teor de nitrogênio.

Frengova et al., (1994) apud Maldonade (2003) estudaram a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, em escala piloto. O meio de fermentação era composto de ultrafiltrado de soro de leite, com concentração de lactose variando de 3,9 a 7,1% . A máxima produção de carotenóides obtida foi de 268 mg/g de células secas, no meio contendo 3,9% de fonte de carbono. Eles observaram que a produção de carotenóides foi paralela ao crescimento celular, porém, a produção máxima de células e a máxima concentração do pigmento não ocorrem simultaneamente. A máxima concentração de carotenóides ocorreu quando o crescimento celular já havia cessado. Os três principais carotenóides identificados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) foram β -caroteno (43,9 μ g/g), toruleno (23 μ g/g) e torularrodina (182 μ g/g).

Fang; Chiou (1993) apud Maldonade (2003) determinaram que os valores de rendimento celular ($Y_{x/s}$) de *P. rhodozyma* em vários substratos (g de células secas/g de açúcar consumido): fonte de nitrogênio, 17,7 -19,6; fosfato, 87,2; potássio, 65,8; magnésio, 1.040 e

cálcio, 2687. O baixo valor do rendimento da biomassa de nitrogênio indicava que a utilização deste substrato estava relacionada ao acúmulo de carotenóides na célula. Estes autores sugeriram que seria interessante determinar os valores de rendimento celular das linhagens selvagens, assim como das linhagens hiperprodutoras de carotenóides.

De acordo com Reed (1982) apud Maldonade (2003), o teor de proteínas na biomassa celular de leveduras variou de 40 a 65%, dependendo das condições de cultivo e da composição do meio de cultura. Johnson et al., (1980) apud Maldonade (2003) determinaram um teor de proteína em *Xanthophyllomyces dendrorhous* de 30%, enquanto que Martin et al., (1993) apud Maldonade (2003) relataram 47%. Em *Rhodotorula rubra*, os teores de proteínas relatados foram de 48% (MARTIN et al., 1993 apud MALDONADE, 2003), 45% (MOO-YOUNG et al., 1979) e 38,2% (MATELLI et al., 1990 apud ZEB-MEHMOOD, 2004). Em outro estudo, Jacob (1991) determinou teor de proteína de 21,6% em *Rhodotorula gracilis*.

A fonte de carbono teve efeito significativo na produção de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*, porém concentrações altas de glicose inibiram a carotenogênese, enquanto que sacarose, maltose e celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados na pigmentação das colônias. As fontes de carbono que favoreceram melhor crescimento celular foram sacarose e glicose (SUTHERLAND et al., 1996 apud MALDONADE, 2003).

Yamane et al., (1997) apud Maldonade (2003) observaram que houve aumento de até 12 vezes da produção de β -caroteno quando *P. rhodozyma* foi crescida num meio com concentração de açúcar de 5% (p/v). Resultados similares foram obtidos por Haard (1988) apud Maldonade (2003), que isolou β -caroteno e β -zeacaroteno como principais pigmentos de meio de fermentação com 100 g/L de glicose.

Fang; Chiou (1993) apud Maldonade (2003) aumentaram a produção de astaxantina por *P. rhodozyma*, otimizando as condições de cultivo. O extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de astaxantina, resultando numa concentração máxima de 8.637,5 $\mu\text{g/L}$. Das fontes de carbono estudadas, a glicose foi a que obteve maior concentração de astaxantina (7.809,3 $\mu\text{g/L}$).

A produção de astaxantina por culturas de *Haematococcus pluvialis* crescidas com suplementação de nitratos foi mínima em comparação à culturas crescidas sem suplementação de nitratos (KANG et al., 2007).

1.3.2.4 Efeito da intensidade luminosa na produção de carotenóides

O efeito da luz na produção de carotenóides por leveduras vem sendo estudado há muito tempo (LEDERE, 1993 apud MALDONADE, 2003). Em 1952, Praus observou que a síntese de carotenóides em *Rhodotorula gracilis* era efetuada pela luz, assim como a composição relativa de cada carotenóide produzido. Por outro lado, Nakagawa; Tatsumi (1960) apud Maldonade 2003 verificaram que a concentração de carotenóides produzida por *Rhodotorula* sp. não era alterada pela presença da luz. O efeito da iluminação durante o processo de fermentação parece variar de acordo com cada espécie de organismo.

Em alguns organismos, a quantidade de luz aumenta o nível de síntese de carotenóides, enquanto em outros, é o gatilho para o início do processo carotenogênico (BATRA, 1971 apud LAMPILA et al., 1985).

A acumulação de astaxantina pelos microrganismos pode ser induzida sob condições de estresse, como deficiência de nutrientes, alta intensidade de luz, suplementação de luz azul e a adição de suplementos oxidativos no meio (LABABPOUR et al., 2004).

A microalga fotossintética *Haematococcus pluvialis* é uma fonte em potencial de astaxantina, sendo utilizada como um aditivo alimentar para a pigmentação de salmão e aves domésticas criados em cativeiros, bem como substância antioxidante. No entanto, a eficiência da produção de astaxantina em cultivo em batelada é baixa, devido à concentração celular ($<0,7 \text{ mg/cm}^3$), ocorrendo uma limitada acumulação da astaxantina ($<25 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$) (LOERNZ; CYSEWSKI, 2000 apud LABABPOUR et al., 2005).

As lâmpadas LEDs (light emitting diode) emitem luz com comprimento de onda variável. Segundo Kim, et al., 2006 vários fatores afetam a acumulação de astaxantina em *Haematococcus pluvialis*: limitação de nutriente ou suplemento, estresse de oxigênio, alta intensidade de luz e luz azul. Dentre esses, o efeito da luz azul é o fator mais importante para o acúmulo de astaxantina. A luz é tão importante para a produção de astaxantina, que num futuro próximo ela poderá ser a resposta para a sua produção. Quando culturas de *H. pluvialis* são iluminadas continuamente por LEDs azul (λ_{max} de 470 nm), a concentração de astaxantina aumentou rapidamente, enquanto que na presença de LEDs vermelho (λ_{max} de 625nm) inicia de maneira tardia e diminui com o tempo (KATSUDA, et al., 2004 apud LABABPOUR et al., 2005; LABABPOUR et al., 2005). Segundo Katsuda et al., (2004) apud LABABPOUR et al., 2005, LEDs que emitem baixos comprimentos de onda (380 - 470 nm), ocorrendo apenas a indução da mudança morfológica em *H. pluvialis* e aumento na acumulação da astaxantina, embora a indução cause a supressão do crescimento celular.

O mecanismo da fotoindução é ativado pelo fotorreceptor que absorve a energia da luz. O fotorreceptor é responsável pela ativação da carotenogênese, que é determinada pela exposição de seletos microrganismos a luzes com diferentes comprimentos de onda. O aumento da produção de caroteno também tem sido relatado com a fotoindução por comprimentos de onda com determinados espectros de ação e certos tipos de fotorreceptores. A quantidade de luz, pH, presença de oxigênio, tempo de exposição de luz e tipo (cor) da luz influencia na extensão da fotoindução e resultado da carotenogênese (LAMPILA et al., 1985). Batra, (1971) apud Lamplia et al., (1985), hipotetizou que um rol de diferentes luzes afeta a carotenogênese. Um composto, como o repressor sob ausência de luz ou induzido quando foto-oxidado pode resultar em síntese de enzimas carotenogênicas. Isto é baseado no fato de que o sistema de transporte de elétrons não tem efeito. Fatores de suporte na indução de enzimas incluem o requerimento de uma fonte de nitrogênio, uma fase Lag antes do aparecimento do aumento da carotenogênese e a sensibilidade do organismo de inibir a biossíntese protéica. Essa teoria pode ser explicada em *Neurospora crassa* onde a enzima pré-fitoeno pirofosfato sintetase é plenamente fotoinduzida. A quantidade de prenil transferase (geranil-geranil-pirofosfato sintetase) que está presente em células crescidas no escuro é dobrada muitas vezes através da exposição da luz (LAMPILA et al., 1985).

Tada et al., (1990) mostraram que em *Rhodotorula minuta*, o fitoeno e outros carotenóides tiveram concentrações baixas quando as células foram cultivadas no escuro, mas estas concentrações aumentaram quando as células foram cultivadas sob iluminação. Os autores concluíram que as enzimas necessárias para converter o fitoeno em outros carotenóides não eram induzidas pela luz e somente as enzimas envolvidas na síntese de fitoeno sofreram influência da luz. Tada; Shiroishi (1982) realizaram outro trabalho com a finalidade de observar o efeito da atividade enzimática de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A redutase (HMG-Co-A) em relação à intensidade luminosa. Eles observaram que a atividade enzimática da HMG-Co-A redutase foi maior para as células cultivadas sob iluminação, ou seja, a atividade enzimática é influenciada pela intensidade luminosa, utilizada durante a fermentação.

Embora a síntese de carotenóides seja estimulada pela luz, estudos realizados por Johnson et al (1980) apud Maldonade (2003) revelaram que a intensidade luminosa não influenciou a pigmentação das células. Estudos realizados posteriormente por An; Johnson (1990) apud Andrade (2003), utilizando alta intensidade luminosa, mostraram que a luz inibiu o crescimento celular e a formação de pigmentos. Foi observado, também, que houve aumento na produção de β -zeacaroteno, indicando a presença de estresse celular. Mutantes hiperprodutores de carotenóides foram menos susceptíveis a ação da luz.

A combinação da antimicina e luz foi estudada por aumentar significativamente os níveis de carotenóides em *P. rhodozyma* (TADA; SHIROISHI, 1982). A luz restaurou o crescimento de células anteriormente inibidas por antimicina depois de 12-24 horas, sugerindo que a luz deve induzir uma via respiratória alternativa, facilitando a oxidação de NADPH e favorecendo o crescimento celular.

Tada; Shiroishi, (1982) estudaram o efeito da adição de inibidores de proteínas e ácidos nucleicos, como 5-fluordesoxiuridina e 5-fluoracila, quando estes foram adicionados aos meios de cultivo em ensaios realizados no escuro. Os pesquisadores observaram que fluordesoxiuridina e 8-fluoracila reduziram a produção de carotenóides.

Vásquez; Santos (1998) apud Maldonade (2003) verificaram que *Xanthophyllomyces dendrorhous* quando cultivada sob iluminação produziu astaxantina como principal carotenóide. Entretanto, quando esta levedura foi cultivada na ausência de luz, o carotenóide principal encontrado foi o HDCO, com concentração acima de 0,75 mg/L.

Culturas de *Blakeslea trispora* exposta à luz esporulam melhor e formam mais pigmentos do que quando incubadas no escuro. A esporulação de *Verticillium agaricinum* não é fotorregulada nem afetada por luz UV. Quando o micélio não é sensível à luz, a luz não afeta seu crescimento (LAMPILA et al., 1985).

1.3.2.5 Utilização de fontes alternativas na produção de carotenóides

A milhocina (CSL = Corn Steep Liquor) é um subproduto do processamento do milho, contendo 40% de sólidos totais e correspondendo à água de lavagem e embebição dos grãos, quando do fracionamento em amido e germe (óleo). Em relação ao caldo de cana não suplementado, a milhocina pode duplicar ou triplicar o teor de carotenóides totais se adicionada na base de 0,1 a 0,2 mL/% de meio de cultura (FONTANA et al., 2000).

Shih; Hang (1996) apud Maldonade (2003) usaram resíduos da produção de chucrutes como substrato para o meio de fermentação de *R. rubra*. A produção máxima dos carotenóides totais, expresso como β -caroteno, foi de 1.041 μ g/L ou 131 μ g/g em relação ao peso seco, após 48h de crescimento a 30°C e pH inicial de 5,0. Eles concluíram que este resíduo industrial pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de carotenóides.

Hayman et al., (1995) apud Maldonade (2003) estudaram o crescimento de *P. rhodozyma*, utilizando farelo de milho como fonte de nitrogênio, sendo realizados ensaios contendo meio YM (Yuca mínimo) com e sem o farelo de milho. Os ensaios foram realizados a 20°C, 300 rpm em agitação por 72 horas. Após a centrifugação a 12.000 X g por 10 minutos, as células foram

lavadas com água destilada e secas em estufa. Os carotenóides foram extraídos com acetona ácida, até as células não apresentarem mais coloração. A concentração total de carotenóides foi medida em espectrofotômetro DU-65. Estes pesquisadores concluíram que o farelo de milho pode servir como substrato para a produção de carotenóides, uma vez que a concentração destes foi de 2,4 µg/mL e de 2,1 µg/mL quando se utilizou meio com e sem farelo, respectivamente.

Haard (1988) apud Maldonade (2003) otimizou a produção de astaxantina a partir da fermentação com melaço como fonte de carbono. Os ensaios foram realizados em agitação a 22°C, pH 5,0 e 50 mmoles de oxigênio L.h. Utilizando-se a concentração de 1% de açúcar, a concentração da astaxantina no meio contendo L-arabinose foi de 379 mg/g de biomassa seca de levedura, e de 552 mg/g de biomassa seca de levedura quando se utilizou melaço. Entretanto, o aumento da concentração de glicose de 1 a 4% (p/v) resultou em diminuição da concentração de astaxantina.

MEYER; Du PREEZ, 1993 apud Moriel, 2005 cita que muitos autores adicionam ácido acético e ácido mevalônico na fermentação de *P. rhodozyma*. Calo et al., (1995b) apud Maldonade (2003) verificaram que a adição de mevalonato aumentou significativamente a produção de carotenóides, porém a sua utilização em escala industrial torna-se inapropriada devido ao seu alto custo.

1.3.3 Aspectos industriais da produção de carotenóides

O crescimento da aquicultura na década de 80, bem como o papel biológico dos carotenóides no combate a doenças humanas, aumentou a demanda por carotenóides (JOHNSON; SCHROEDER, 1995). Embora mais de 600 carotenóides tenham sido identificados de várias fontes, apenas 40 são encontrados em alimentos e, somente alguns destes são utilizados industrialmente como corantes ou substâncias bioativas em rações, cosméticos, alimentos e fármacos. A coloração é uma característica importante na indústria alimentícia, incentivando assim na motivação do consumidor, durante a aquisição de determinados produtos que apresentem uma tonalidade agradável (MERCADANTE; RODRIGUEZ-AMAYA, 1998).

Nas indústrias de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corante, com os objetivos de: repor a cor perdida durante o processamento e a armazenagem, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Mais recentemente, com o crescente interesse pela saúde, os carotenóides também têm sido adicionados em vitaminas e suplementos alimentares devido as suas atividades biológicas (anticarcinogênica, imunomoduladores, antioxidante, pró-vitamina A), a fim de enriquecer o

produto alimentar. São também precursores de compostos voláteis, aos quais contribuem para o sabor e aroma de alimentos. A presença de pequenas quantidades de carotenóides em alimentos pode ajudar na prevenção da rápida oxidação dos constituintes dos alimentos, sequestrando oxigênio singlete (JOHNSON; SCHROEDER, 1995; AUSICH, 1997; MALDONADE, 2003).

Nas indústrias de ração, esses pigmentos também são utilizados como corante, com a finalidade de promover a pigmentação adequada dos animais. Destacando-se o uso de astaxantina na criação de truta (*Truta truta*, *Truta fario*) e salmão (*Salmo salar*), para este fim, krill e cascas de camarão, lagosta e outros crustáceos também são utilizados, além de astaxantina sintética. (FANG; CHENG, 1993; JOHNSON; AN, 1991; STOREBAKKEN; NO, 1992).

Atualmente, os carotenóides utilizados industrialmente são obtidos por via sintética ou extraídos a partir de plantas ou algas. Porém, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos e, muitas patentes têm sido registradas nos últimos anos.

Dentre os naturais, os vegetais como o Urucum, a páprica e o açafrão vêm sendo utilizados há muito tempo. As substâncias mais encontradas nesses extratos naturais são: bixina de urucum, capsantina e capsorubina de páprica, e crocetina de açafrão (MERCADANTE et al., 1996).

A produção de carotenóides por microrganismos também se deve ao crescente mercado da piscicultura, sendo que a astaxantina é o pigmento mais importante para o cultivo de salmão e crustáceos. A utilização de microalgas, principalmente em ração animal foi iniciada a partir de 1970 e posteriormente culturas comerciais conquistaram o mercado na Austrália, Israel e Estados Unidos da América (NOMOMURA, 1990). As pétalas de *Tagetes erectas* vêm sendo comercializadas, principalmente pelo México, para incorporação em rações para aves, já que a luteína, carotenóide principal das pétalas, é seletivamente acumulada pelas aves, colorindo assim sua pele, a carne e a gema do ovo (MALDONADE, 2003).

Sendo lipofílicos e capazes de ligar-se com superfícies hidrofóbicas, os carotenóides são encontrados na natureza sob diversas formas, como soluções oleosas, dispersões coloidais ou complexados com proteínas; assim, ocorrem tanto em meios lipídicos como em meios aquosos. Sendo, portanto, comercializados como suspensões oleosas para alimentos à base de óleo ou como emulsões ou preparações coloidais coloridas dispersíveis em alimentos à base de água. Nestas formulações, os carotenóides são fisicamente estabilizados, embora antioxidantes possam ser adicionados (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

Segundo Ausich (1997), vários carotenóides podem ser obtidos sinteticamente com

muitas vantagens, como por exemplo, a produção de carotenóides com pureza e consistência e custos relativamente baixos, porém existem muitas desvantagens: 1) A síntese de certos carotenóides é muito complexa; 2) O conhecimento e tecnologia desenvolvida para a síntese de um carotenóide pode ser aplicado para a síntese de outros carotenóides, mas frequentemente, a síntese de um novo carotenóide requer o desenvolvimento de uma nova rotina química; 3) A síntese química produz misturas de estereoisômeros, alguns dos quais não são encontrados na natureza, podendo não ser tão ativo quanto o seu isômero e não ser de desejo do consumo público ou causando efeitos indesejáveis.

A produção biológica de carotenóides é muito vantajosa e existem aproximadamente 600 carotenóides produzidos por diferentes vias biossintéticas. Os parâmetros da produtividade para a produção biológica dos carotenóides são os custos da produção de biomassa, a concentração e atividade produtiva intracelular (AUSICH, 1997). Por causa das características de biossíntese de carotenóides, o conhecimento da via sintética de um é aplicável a outros carotenóides. Com a produção biológica, apenas naturalmente ocorrem estereoisômeros e, finalmente, todas as técnicas modernas de bioprocessos e de DNA recombinante podem ser utilizadas no desenvolvimento de sistemas para a produção de carotenóides (AUSICH, 1997).

Rodriguez-Amaya (2001), descreve que, como corantes alimentícios, os carotenóides oferecem as seguintes vantagens: (1) são compostos naturais; (2) possuem boa estabilidade na faixa de pH da maioria dos alimentos; (3) não são afetados por substâncias redutoras; (4) não são corrosivos; (5) alguns são precursores de vitamina A; (6) possuem ação contra doenças degenerativas. As desvantagens apresentadas são: (1) custos mais altos em relação aos corantes azo; (2) faixa de coloração limitada; (3) susceptibilidade à degradação oxidativa; (4) limitada solubilidade em óleo e insolubilidade em água. As duas últimas constituem um dos grandes obstáculos para a comercialização dos carotenóides.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULUS, C. J., MIMS, C. W. **Introductory Mycology**. Blackwell, New York, USA, 869p. 1996.
- AN, G.; JOHNSON, E. A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Antonie Van Leeuwenhoek**. V. 57, p. 191-203, 1990. In ANDRADE, S. A. **Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)**. 2003.145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- AN, GIL-HWAN; BIELICH, J.; AUERBACH, R.; JOHNSON, E. A. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeasts by flow cytometry and cell sorting. **Biotechnology**. V. 9, p. 70-73, 1991. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- ANDRADE, S. A. **Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)**. 2003.145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- 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. [S.I].
- ASTORG, P. Trends Food Science Technology. V. 8, p. 406-413, 1997. [S.I] In FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 24, p. 90-95, 2006. [S.I].
- AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Appl. Chem**, v. 69, n. 10, p. 2169-2173, 1997. [S.I].
- BRANLEY, P. M.; MACKENZIE, A. Carotenoid biosynthesis and regulation in fungi. In Arora, D. K.; Elander, R. P.; Mukerji, K. G. (Eds.), **Handbook of Applied Mycology**, Marcel Dekker, New York, p 401-444, 1992.

BRITTON, G. UV/Visible spectroscopy. In BRITTON, G.; PFANDER, H.; LIAAEN-JENSEN, S. (Eds.), **Carotenoids**. V. 1B: Spectroscopy. Birkhauser Verlag, Boston. P. 13-62. In ANDRADE, S. A. **Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)**. 2003.145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. In FASEB J. vol. 9, 15151-1558, Methods in Enzymology. Nº 213, p. 3-13, 1992. In ZEB, A.; MEHMOOD, S.; Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. **Pakistan Journal of Nutritional**. Asian Network for scientific information. Pakistan, v. 3, nº 3, p. 191-204, 2004. [S.I].

CALO, P.; VELASQUEZ, J. B.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. **Journal of Agricultural Chemistry**. V. 43, p. 1396-1399, 1995a. MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CALO, P.; MIGUEL, T.; VELASQUEZ, J. B.; VILLA, T. G. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**. V. 17, p. 575-578, 1995b. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CHOUBERT, G.; DENTELLA, E.; ATGIÉ, C.; BACCAUNAUD, M. Effect of light on colour stability of sliced smoked rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed astaxanthin. **Food Research International**, v. 38, p. 949-952, 2005. [S.I].

CHOUBERT, G.; PINTO, M. M. M.; MORAIS, R. Pigmenting efficacy astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary astaxanthin and lipid sources. **Aquaculture**, v. 257, p. 429-436, 2006. [S.I].

DI MASCIO, P.; KRAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 274, p. 532-538, 1989.

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

FANG, T. J., CHENG, Y. S., Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodzyma* through mutation and optimization of culture conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Vol. 75, 466-469, 1993.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Optimization of cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. V. 75, p. 466-469, 1993. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FRASER, P. D.; RUIZ-HIDALGO, M. J. LOPEZ-MATAS, M. A. Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.289, p. 203-208, 1996. [S.I]. In ANDRADE, SOUZA ANDRADE. **Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)**. 2003.145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

FRENGOVA, G. L.; SIMOVA, E. D.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, D. M.; GRICROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis*. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 44, p. 888-894, 1994. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FRENGOVA, G. L.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**. V. 17, p. 1001-1006, 1995. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. Carotenóides Cores Atraentes e Ação Biológica. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**. V. 13, p. 40-45, 2000.

FOSTER, J. W. Chemical activities of fungi. Academic Press Inc. New York, 1949. In ORLOWSKI, M. Mucor Dimorphism. **Microbiological Reviews**, v. 55, n.2, p. 234-258, June, 1991. [S.I].

FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 24, p. 90-95, 2006. [S.I].

GONG, X.; CHEN, F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Process Biochemistry**. V. 33, n. 4, p. 385-391, 1998. [S.I].

GOODWIN, T. W.; JAMIKORN, M. Studies in carotenogenesis II. Carotenoid synthesis in alga *Haematococcus pluvialis*. **Biochemical Journal**. V. 54, p. 376-399, 1954. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GOODWIN, T. W. Nature and distribution of carotenoids. **Food Chemistry**. V. 5, p. 3-13, 1980. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GROSS, G. J.; LOCKWOOD, S. F. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (*Cardax*TM). **Life Sciences**, v. 75, p. 215-224, 2004. [S.I].

GROSS, J. BUDOWSKI, P. Conversion of carotenoids into vitamins A₁ and A₂ in two species of freshwater fish. **Biochem. J.** V. 101, p. 704-754, 1966. [S.I]. In MOREN, M. NAESS.; HAMRE, K. Conversion of b-carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. **Fish physiology an Biochemistry**. Netherlands, v. 27, p. 71-80, 2002.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnology**, v. 21, p. 210-216, 2003. In SUTH, I. S.; JOO, H. N.; LEE, C. G. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. **Journal of Biotechnology**, n. 125, p. 540-546, 2006. [S.I].

GUTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000 – A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 899, p. 136-147, 2000.

HAARD, N. F. Astaxanthin formation by yeasts on molasses. **Biotechnology Letters**. V. 10, p. 609-614, 1988. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**. V. 120, p. 1339-1343, 1974. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

HAYMAN, G. T.; MANNARELLI, B. M.; LEATHERS, T. D. Productions of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. **Journal of Industrial Microbiology**. V. 14, p. 389-395, 1995. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

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. [S.I.].

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J.; GRAU, C. R. Pigmentation of eggs yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Poultry Science**. V. 59, p. 1777-1782, 1980. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

JACOB, Z. Enrichment of wheat bran by *Rhodotorula gracilis* through solid-state fermentation. **Folia Microbiology**. V. 36, p. 86-91, 1991. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**. Vol. 11, p. 225-236, 1991.

JOHNSON, E. A.; GIL-HWAN AN. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Review in Biotechnology**. V. 11, p. 297-326, 1995. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

JOHNSON. E. A. SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering**, v . 53, p. 119-178, 1995. [S.I].

KAERPINTONG, K; SHOTIPRUK, A.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. **Bioresource Technology**, p. 1-8, 2006. [S.I].

KANG, C. D.; LEE, J. S.; PARK, T. H.; SIM, S. J. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. **Applied Microbiology Biotechnology**. N° 74, p.987–994, 2007.

KATSUDA, T.; LABABPOUR, A.; SHIMAHARA, K.; KATOH, SHIGEO. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 81-86, 2004, [S.I]. In LABABPOUR, A.; SHIMAHARA, K.; HADA, K.; KYOUI, Y.; KATSUDA, T.; KATOH, S. Fed-batch culture under illumination within blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n. 3, p. 339-342, 2005. [S.I].

KIM, Z. H.; KIM, S. H. LEE, H. S., LEE, C. G. Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 414-419, 2006. [S.I].

KRINSKY, N. I. Carotenoids in medicine. IN ANDRADE, S. A. **Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)**. 2003.145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

LABABPOUR, A.; SHIMAHARA, K.; HADA, K.; KYOUI, Y.; KATSUDA, T.; KATOH, S. Fed-batch culture under illumination within blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n. 3, p. 339-342, 2005. [S.I].

LABABPOUR, A.; KEISHI, H.; SHIMAHARA, K.; KATSUDA, T.; KATOH, S. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 6, p. 452-456, 2004. [S.I].

LAMPILA, L. E.; WALLEN, S. E.; BULLERMAN, L. B. A review of factors affecting, biosynthesis of carotenoids by the order *Mucorales*. **Mycopathologia**. Netherlands, v. 90, p. 65-80, 1985. [S.I].

LEDERE, E. Carotenoid of red yeast. **Compt. Rend.** V. 197, p. 1964-1965, p. 1933. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

LOUGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P; S.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo- I. Constituintes celulares. **Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17-37, 2006. [S.I].

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potencial for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends Biotechnology**. V. 18, p. 160-167, 2000. [S.I]. In LABABPOUR, A.; SHIMAHARA, K.; HADA, K.; KYOUI, Y.; KATSUDA, T.; KATOH, S. Fed-batch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V. 100, n. 3, p. 339-342, 2005. [S.I].

MATELLI, H. L.; DE SILVA, I. M.; SOUZA, N. O.; POMEROY, D. Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. **Biotechnology Letters**. V. 12, p. 207-208, 1990. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MANGELS, A. R.; HOLDEN, J. M.; BEECHER, G. R.; FORMAN, M. R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of the American Dietetic Association*. V. 963, p. 284-296, 1993. In ZEB, A.; MEHMOOD, S.; Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. **Pakistan Journal of Nutritional**. Ed. Asian Network for scientific information. Pakistan, v. 3, n. 3, p.191-204, 2004. [S.I].

MARGALITH, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 51, p. 431-438. [S.I.]

MARTIN, A. M.; LU, C.; PATEL, T. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. V. 76, p. 321-325, 1993. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 46, p. 4102-4106, 1996.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; Effects and evaluation of astaxanthin overproduction mutants of *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V. 46, p. 128-130, 1998.

MEYER, P. S. AND DU PREEZ, J. C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**. Nº 15, p. 919-924, 1993. In Moriel, D. G.; Chociai, M. B. ; Chociai, 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*. vol. 48 no.3 Curitiba May 2005.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 40, p. 789-785, 1994b. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MORIEL, D. G. Otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* utilizando processo descontínuo alimentado. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, 2004. In Moriel, D. G.; Chociai, M. B. ; Chociai, 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**. vol. 48 no.3 Curitiba May 2005.

MORIEL, D., M.; CHOCIAI, 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**. Brazil, Vol.48, nº 3, p. 397-401, May 2005.

MORTENSEN, A.; SKISTED, L. H.; SAMPSON, J.; RICE-EVANS, C.; EVERETT, S. A. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. **Federation of European Biochemical Societies**. FEB Letters, v. 418, p. 91-97, 1997.

MISAWA, N., NAKAGAWA, M., KOBAYASHI, K., YAMANO, S., IZAWA, Y., NAKAMURA, K., HARASHIMA, K. Elucidation of Pathway the *Erwinia uredovora* Carotenoid Biosynthetic by Functional Analysis of Gene Products Expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, American Society for Microbiology, v. 172, n. 12, p. 6704-6712, 1990. [S.I].

MISAWA, N. SATOMI, Y., KONDO, K., YOKOYAMA, A., KAJIWARA, S., SAITO, T., OHTANI, T., MIKI, W. Structure and Functional Analysis of a Marine Bacterial Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster and Astaxanthin Biosynthetic Pathway Proposed at the Gene Level. **Journal of Bacteriology**, American Society for Microbiology, v. 177, n. 22 p. 6575-584, 1995. [S.I].

MOO-YOUNG, M.; DAUGULIS, A. J.; CHAHAL, D. S.; MACDONALD, D. G. The waterloo process for SCP production from waste biomass. **Process Biochemical**. V. 14, p. 38-40, 1979. [S.I]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MOREN, M. NAESS, T. HAMRE, K. Conversion of β -carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 27, p. 71-80, 2002. [S.I].

NAKAHAWA, M.; TATSUMI, C. Studies on the carotenogenesis of *Rhodotorula* sp. **Journal of Agricultural Chemistry of Japan**. Japan, v. 34, p. 195-198, 1960. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

NAGUIB, Y. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Chemistry**. V. 48, p. 1150-1154, 2000.

NELIS, H. J., DE LEENHER, A. P. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. **Journal Applied Bacteriology**. N° 70, p. 421-426, 1991.

NONOMURA, A. M.; Carotenoids: Chemistry and Biology. In Krinsky, N. I.; Mathews-Roth, M.M., Taylor, R. F. (Eds), Plenum Press, New York, v. 33, p. 181-187, 1990.

OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Influence of mixed culture conditions on yeast wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal Applied Bacteriology**. V. 59, p. 243-255, 1984. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ONG, A. S. H.; TEE, E. S. Natural sources of carotenoids from plants and oils. Methods in Enzymology. Academic Press Ltd. V. 213, p. 142-167, 1992. In ZEB, A.; MEHMOOD, S.; Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. **Pakistan Journal of Nutritional**. Ed. Asian Network for scientific information. Pakistan, v. 3, n. 3, p. 191-204, 2004. [S.I].

PAPP, T.; VELAYOS, A.; BARTÓK, T. Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**. n. 69, p. 526-531, 2006. [S.I].

PATTON, S.; CANFIELD, L. M.; HOUSTON, G. E.; FERRIS, A. M.; JENSEN, R. G. Carotenoids of human colostrums. **Lipids**. v. 25, p. 159-165, 1990. [S.I].

PFANDER, H. Carotenoids: an overview. In Britton, G. S., Liaaen – Jensen, Pfander, H. (Eds.), Carotenoids. **Methods in Enzymology**. n. 213, p. 3-13, 1992. [S.I].

PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, NOEL R **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, São Paulo, 1997.

PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GAYZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Archives Microbiology**. V. 168, p. 173-179, 1995. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

RATLEDGE, C. Yeasts and moulds as sources of oils and fats. (1981) In PRYDE, E. H.; MURKHERJEE, K. D. (ed.), **New Sources of Fats and oils**. American oil Chemistry society, Champaign, IL. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

REED, G. Microbial biomass, single cell protein and other microbial products. 1982 In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

RODRIGUEZ – AMAYA, D. B. Carotenóides: estruturas, propriedades e funções. **Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade de Campinas, São Paulo**. P 20-23, 1993.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. OMNI Research, United States of America, 71 p., 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D., B.; KIMURA, MIEKO. **Harvestplus handbook for Carotenoid Analysis**. Harvestplus Technical Monograph 2. Washington DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT). 58p, 2004.

SARADA, R.; TRIPATHI, U.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. **Process Biochemistry**, n. 37, p. 623-627, 2002. [S.I.].

SHIH, C T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. **Lenbesm.- Wiss. U. – Technology**. V. 29, p. 570-572, 1996. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SIEVERS, N.; BERTSCH, E.; FISHER, R. Isolation of nuclear migration mutants of *Aspergillus nidulans* using GFP expressing strains. **Micological Research**. V. 103, p. 961-966, 1999. [S.I.]. In LOUGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P; S.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo- I. Constituintes celulares. **Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17-37, 2006. [S.I.].

SIMPSON, K. L.; KATAYAMA, T.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigments of yeasts. **Academic Press**. New York, p. 493-515, 1971 In ANDRADE, S. A. **Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)**. 2003.145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

STOREBAKKEN, T., NO, K. H. Pigmentation of rainbow trout. **Aquaculture**. N° 100, p. 209-229, 1992.

STEINBRENNER, J.; LINDEN, H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. **Plant Molecular Biology**. V. 52, p. 343-356, 2003.

SUTHERLAND, F. C. W.; KILIAN, S. G.; PREEZ, J. C. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**. V. 18, p. 975-980, 1996. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

TADA, M.; SHIROISH, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* V. Photoinduction of 3-hydroxy-3-methyl Glutaryl coenzyme A reductase. **Plant & Cell Physiology**, v 23, n. 4, p. 615-621, 1982. [S.I.].

TADA, M., TSUBOUCHI, M., TAKIMORO, H., KIMURA, Y., TAKAGI, S. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* III. Effect of mevlinol on photoinduced carotenogenesis. **Plant Cell Physiology**. N ° 31, p. 319-323, 1990.

UENOJO M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, Vol. 30, N° 3, p. 616-622, 2007.

Van der MEEREN. Biochemical composition of Copepods: seasonal variation in lagoon-reared zooplankton. **Larvi'01-Fish and shellfish larviculture Symposium**. Ghent Belgium, European Aquaculture Society. [S.I.]. In MOREN, M. NAESS.; HAMRE, K. Conversion of b-carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. **Fish physiology and Biochemistry**. Netherlands, v. 27, p. 71-80, 2002.

VÁSQUEZ, M.; SANTOS, V. 3-OH-3', 4'-dihidro- β - ψ -caroteno-4-ona (HDCO) from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media. **Biotechnology Letters**. V. 20, p. 181-182, 1998. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

WOODALL, A. A.; BRITTON, G.; JACKSON, M. J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochemical Acta**. V. 1336, p. 578-586. 1997.

YAMANE, Y.; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 63, p. 4471-4478, 1997. [S.I.]. In MALDONADE, I., R. **Produção de carotenóides por leveduras**. 2003. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ZEB, A.; MEHMOOD, S.; Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. **Pakistan Journal of Nutritional**, Pakistan, v. 3, n. 3, p. 191-204, 2004.

CAPÍTULO II

Produção de astaxantina por *Mucor javanicus* (UCP-69), utilizando meio definido e resíduos industriais (milhocina e quirera)

Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista Food Biotechnology.

Produção de astaxantina por *Mucor javanicus* (UCP- 69), utilizando meio definido e resíduos industriais (milhocina e quirera)

Barbosa - Silveira, A. A.; Alves da SILVA, C. A.; Okada, K.

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco.

To increase the accumulation of astaxanthin, the effects of different corn waste media, including corn steep liquor (CSL) and "quirera". As well as illumination with blue Light Emitting Diodes (LEDs), on the accumulation of astaxanthin were studied for the cultivation of *Mucor javanicus*. In the presence of blue LEDs using the CSL, 4%, 96h, the concentration of astaxanthin increase almost 100%. With "quirera", 7%, 96h, increase almost 75%. And with CSL "quirera", increase almost 47%. First time we describe the "quirera" utilization from carotenoid's production was in this article.

Keywords: Astaxanthin; *Mucor javanicus*; Industry waste; Corn waste; Corn steep liquor.

INTRODUÇÃO

A astaxantina (3,3'-dihidroxi-44'-diceto- β -caroteno) é o carotenóide muito difundido comercialmente e possui alto valor econômico, principalmente nas indústrias de cosméticos, alimentos e ração, visando à pigmentação dos animais, como aves domésticas e peixes, em especial, Truta (*Truta truta*, *Truta fario*) e salmão (*Salmo salar*) (FANG;CHENG, 1993; JOHNSON; AN, 1991; STOREBAKKEN; NO, 1992). Astaxantina é considerada um importante e poderoso antioxidante, muitas vezes maior que outros carotenóides, principalmente devido à sua atividade precursora de vitamina A, substância eficiente no combate de várias enfermidades (JOHNSON; AN, 1991; GROSS; LOCKWOOD, 2004).

A astaxantina pode ser obtida de fontes naturais ou sintéticas, onde a síntese química pode resultar em carotenóides desnaturados, com eficiência diminuída e, por isso, existe a

preferência em se utilizar astaxantina de fontes naturais, extraída a partir de alguns crustáceos ou obtida por via microbiológica (GONG; CHEN, 1997; JOHNSON; AN; 1991).

Segundo Papp et al., (2006) o fungo *Mucor circinelloides* é um bom candidato para estudos de produção de carotenóides. Recentemente, Andrade (2003), descreveu a obtenção de astaxantina pelo fungo *Mucor Javanicus*.

Vários autores descreveram a utilização desses resíduos, Haard (1988) apud Maldonade (2003) otimizou a produção de astaxantina por leveduras a partir da fermentação com melaço como fonte de carbono. Domínguez-Bocanegra; Torres-Muñoz, (2004), citam resíduos agro-industriais de leite de coco como uma excelente fonte alternativa de carbono para a produção de astaxantina. Hayman et al., (1995) apud Maldonade (2003) estudaram o crescimento de *P. rhodozyma*, utilizando farelo de milho como fonte de nitrogênio. Shih; Hang (1996) apud Maldonade (2003) usaram resíduos da produção de chucrutes como substrato para o meio de fermentação de *R. rubra*. Fontana (2000), descreveu como substrato a milhocina adicionada na concentração de 0,1 a 0,2 mL% ao meio de cultura, como uma fonte produtiva promissora de astaxantina, por aumentar em duas ou três vezes o teor de carotenóides totais.

Muitas pesquisas utilizam lâmpadas LEDs (light emitting diode), com comprimento de onda variável, com o intuito de aumentar a produção de astaxantina. Quando culturas de *H. pluvialis* foram iluminadas por LEDs azul (com absorção de λ_{max} de 470 nm), a concentração de astaxantina aumentou rapidamente, enquanto que na presença de LEDs vermelho (λ_{max} de 625nm) iniciou de maneira tardia, diminuindo com o tempo (KATSUDA, et al., 2004; LABABPOUR et al., 2005).

Neste sentido, vários estudos foram realizados em busca de otimizar a produção de astaxantina por *Mucor javanicus*, contudo, um grande impedimento são os altos custos dos meios de cultura utilizados na fermentação destes microrganismos. Portanto, faz-se necessária a busca por substratos alternativos para a produção de astaxantina. Neste trabalho, resíduos da industrial de milho, milhocina (com steep liquor – CSL) e quirera foram investigados como fontes alternativas para a produção de astaxantina por *Mucor javanicus*, avaliadas também a influência de luz azul contínua e utilizando também um planejamento fatorial 3^3 .

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

A produção de astaxantina foi realizada utilizando a linhagem de *Mucor javanicus* (UCP– 69), depositada no Banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais

(NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco.

Meios de produção de astaxantina

Como parâmetro para análise da eficiência da utilização de um meio de produção de baixo custo, foi utilizado o meio de cultura definido Hesseltine e Anderson (1957) modificado por Andrade (2000) apud Andrade (2003), descrito na literatura como o meio de produção de carotenóides. E como meios alternativos foram utilizados dois subprodutos da indústria do milho na produção de astaxantina. O primeiro foi a quirera, resíduo do farelo de milho, composto de proteína bruta (9,8%), carboidratos totais (85,63%) e compostos nitrogenados não-protéicos (18,51%), segundo Hernández et al., (2002). O segundo foi a milhocina, rejeito da água de lavagem e embebição dos grãos quando do fracionamento em amido e germe (óleo), contendo 40% de sólidos (FONTANA et al., 2000).

Condições de cultivo e de crescimento

O inóculo utilizado para o crescimento em meio líquido foi obtido a partir de culturas crescidas em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), após 5 dias de incubação a 28 °C. A contagem de esporos foi realizada em Câmara de Neubauer, com inóculo padronizado em 10^7 esporos/mL. Para a preparação do pré-inóculo, 5 mL da suspensão de esporos foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio utilizado para a produção de astaxantina. Os frascos foram incubados a 25°C durante 24 horas, sob agitação orbital de 150 rpm. Foram adicionados 1 mL do pré-inóculo (1%, v/v) em frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo 100 mL do meio de cultura de milhocina ® ; milhocina ® com Quirera; Quirera, nas concentrações: 4%, 7% e 10%, durante 48h, 72h e 96h. Como comparativo foi utilizado o meio Hesseltine e Anderson (1957) modificado por Andrade (2000) apud Andrade (2003), descrito na literatura como favorável ao aumento da produção de carotenóides. O pH foi fixado em 6,5, por favorecer o aumento do rendimento da astaxantina, quando a luz é mantida na cor azul, conforme indicação de Andrade (2003), e os cultivos submetidos à agitação de 120 rpm, a 25°C, condições citadas na literatura para a produção de carotenóides a partir de alguns mutantes de *Mucor* (FRASER et al., 1996 apud ANDRADE, 2003; RUIZ-HIDALGO et al., apud ANDRADE, 2003). As culturas foram submetidas a duas formas de iluminação, na primeira, sem a interferência da luz, e na segunda submetido a iluminação com "Leds" (Light Emitting Diodes) (λ_{max} de 470 nm), com intensidade luminosa de 50 Lux, adaptados ao agitador durante o processo fermentativo.

Extração e análise físico-química da astaxantina

As culturas foram coletadas e filtradas em filtro de nylon (Silkscreen) 120F, sendo a massa micelial lavada com água destilada. A biomassa foi congelada e liofilizada e mantida em dessecador até peso constante. A extração do carotenóide foi realizada através da metodologia utilizada por Britton et al., (1985) apud Dominguez-Bocanegra (2004), onde as células foram quebradas utilizando um homogeneizador (Potter), como sistema de solvente foi utilizado hexano e metanol (1:1, v/v), até a total despigmentação da biomassa. A epifase, contendo a astaxantina, foi separada através de centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos. A fração final foi analisada por espectrometria (UV- visível). Todos os ensaios foram realizados de forma randômica e em duplicata. As determinações foram realizadas em espectrofotômetro BIOCHROM LIBRA S32, com o comprimento de onda de 470 nm. A astaxantina foi quantificada utilizando um padrão comercial (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA).

Construção do planejamento fatorial

Com o objetivo de estudar a influência de várias condições de cultivo na produção de astaxantina, foi utilizado um planejamento fatorial 3^3 com um ponto central, com três réplicas, como o primeiro passo em busca de condições experimentais otimizadas. Este planejamento avaliou a influência dos principais fatores, bem como suas interações. Os três fatores estudados e seus respectivos níveis foram: 1) meios: M(milhocina), MQ (Milhocina e Quirera), Q (Quirera); 2) concentração do meio: 4%, 7% e 10%; 3) tempo de cultivo: 48h, 72h e 96h, demonstrados na Tabela 2. 1. Foram realizados dois planejamentos, um para as culturas submetidas à iluminação contínua com LED's azul (λ_{max} de 470 nm) e outro para as culturas crescidas sem qualquer tipo de iluminação. A variável resposta foi a concentração final de astaxantina expressada em $\mu\text{g/g}$ de biomassa. Baseado nos resultados do planejamento fatorial foi aplicada a metodologia de superfície de resposta. Como parâmetro para análise da eficiência da utilização de um dos meios de baixo custo, foi utilizado o meio de cultura Hesseltine e Anderson (1957) modificado por Andrade (2000) apud Andrade (2003).

Análise estatística, desenvolvimento do modelo e teste de significância

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada de acordo com Ramírez (2001), utilizando o Software Statistica 5.0 da Stat Soft. O método de análise das superfícies de resposta foi utilizado para ajustar um modelo matemático aos dados experimentais da produção de astaxantina. O referido Software, para um planejamento fatorial do tipo 3^3 , com ponto central, promove o ajuste da Equação 1, para o experimento submetido à iluminação

contínua com LEDs azul e sem interferência de luz, Equação 2 e 3, respectivamente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_{2,2} X_2^2 + \beta_{3,3} X_3^2 \quad (\text{Equação 1})$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{2,2} X_2^2 + \beta_3 X_3 \quad (\text{Equação 2})$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 \quad (\text{Equação 3})$$

em que:

Y= variável dependente astaxantina;

$\beta_i, \beta_{i,j}$ = coeficientes do modelo, $i = 0, 1, 2, \dots, n$; $j = 1, 2, \dots, m$

X_i = variáveis independentes ou fatores

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de astaxantina utilizando o meio Hesseltine e Anderson (1957)

O meio Hesseltine e Anderson (1957) foi utilizado originalmente para o cultivo de espécies de Zygomycetos em estudos sobre a produção de carotenóides (Hesseltine e Anderson, 1957) e foi modificado por Andrade (2000) apud Andrade (2003) com o objetivo de incrementar a produção de astaxantina. Neste trabalho, independentemente da condição de cultivo, o isolado de *M. javanicus* produziu astaxantina (Tabela 1), sendo que teve o rendimento de 37,7 $\mu\text{g/g}$, quando se utilizou a luz azul e de 26,7 $\mu\text{g/g}$ sem a fonte luminosa.

Produção de astaxantina utilizando os resíduos industriais (milhocina e quirera)

Os resultados da produção de astaxantina com o meio Hesseltine e Anderson (1957) serviram de subsídio para a realização de experimentos com rejeitos industriais de baixo custo, com a finalidade de observar a produção de astaxantina. Para tanto foi necessária a utilização de um planejamento fatorial (3^3) para identificar os fatores ou variáveis independentes que possuem um impacto significativo na variável resposta – produção de astaxantina em diversas condições, submetidas à iluminação com LED's azul (λ_{max} de 470nm) e sem interferência da luz. A Tabela 2 descreve todas as condições e combinações utilizadas neste planejamento. A Tabela 3 demonstra os resultados experimentais da produção de astaxantina e biomassa obtidas a partir de culturas submersas de *Mucor javanicus* submetidas a iluminação com LED's

azul e sem interferência luminosa. Quando se utilizou o meio de produção milhocina (Tabela 3), na condição experimental 3 foi observado um aumento de quase 100%, quando se utilizou a fonte luminosa (55,8 µg/g) em comparação à ausência da luz (28,0 µg/g). Fontana et al., (2000) descreveu que a presença da milhocina no meio de cultivo, pode duplicar ou triplicar o teor de carotenóides totais, se adicionada na base de 0,1% ou 0,2 % /mL. Essas informações corroboram com os resultados obtidos, quando a presença desse substrato duplicou a produção da astaxantina nos ensaios realizados. Quando se utilizou quirera de milho como meio de produção (Tabela 3), na condição experimental 29 foi observado um aumento de 37% da astaxantina, quando se utilizou a fonte luminosa (18,4 µg/g) em comparação à ausência da luz (13,4 µg/g). No entanto, com o meio de produção utilizando milhocina e quirera (Tabela 3), nas condições experimentais 27, 28, 29,30 (ponto central) foi observado um aumento médio de 47% do bioproduto, quando se utilizou a fonte luminosa (18,4 µg/g, em média) em comparação à ausência da luz (13,4 µg/g, em média). Os resultados da utilização da quirera de milho como substrato para a produção de astaxantina, demonstraram-se promissores, apesar do seu baixo rendimento, em comparação ao meio Hesseltine e Anderson (1957) modificado por Andrade (200), indicando que a quirera pode ser um meio de cultura potencial pra a produção de astaxantina. Seria importante a realização de novas pesquisas com esse resíduo, em busca de condições favoráveis a um maior rendimento de astaxantina, pois, dentre todos os artigos pesquisados a respeito da produção de carotenóides, não foi encontrado referência sobre a utilização de quirera de milho, como substrato, portanto, este trabalho descreve pela primeira vez a produção de um carotenóide utilizando-se a quirera de milho.

A partir da análise dos valores simulados e experimentais de astaxantina obtida por culturas de *Mucor javanicus* submetidas a iluminação com LED's azul e sem iluminação, apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente, pode-se inferir que na presença de luz a variável independente milhocina demonstra respostas precisas e exatas, na variável milhocina com quirera as respostas mostraram-se exatas, mas com pouca precisão e a variável quirera, apresenta dados pouco precisos e pouco exatos. Enquanto que na ausência de fonte luminosa, pode-se inferir que a variável independente milhocina demonstra respostas precisas e exatas, já a variável milhocina com quirera as respostas mostraram-se exatas, mas com pouca precisão e a variável quirera, apresenta dados pouco precisos e pouco exatos.

Comparando-se aos resultados obtidos com a utilização do meio Hesseltine e Anderson (1957), modificado por Andrade (2000) apud Andrade (2003), todos os meios de cultura testados possuem potencial para substituir o meio Hesseltine e Anderson na produção de astaxantina. Para isso, devem ser realizados novos experimentos para otimizar os resultados aqui apresentados, em busca de um melhor rendimento da astaxantina.

Influência da luz na produção de astaxantina

Análises estatísticas foram realizadas com os resultados dos rendimentos de astaxantina obtidos nos experimentos a fim de demonstrar a evidência da influência da luz na produção do bioproduto. A partir das análises realizadas no software Statística 5.0, obtivemos a análise de variância (ANOVA) dos resultados. Para as culturas crescidas sob influência de luz azul, a partir da tabela de dados fornecidos pela ANOVA (Tabela 4), observou-se que o modelo quadrático demonstrado na Equação 2, ajustou-se relativamente bem aos dados experimentais, a exceção do termo quadrático de tempo. Como o coeficiente de regressão mostrado pela Tabela 5 não apresenta um valor satisfatório, pois todos os valores de "p" encontram-se abaixo de 5% do limite de confiança a exceção do referido valor do termo quadrático de tempo, podendo assim, o modelo ser corrigido com a exclusão do referido termo. O Diagrama de Pareto (Figura 3) confirma a pequena influência do termo quadrático de tempo. No entanto, Para as culturas crescidas sem influência de luz azul, a partir da tabela de dados fornecidos pela ANOVA (Tabela 6) observou-se que o modelo quadrático demonstrado na Equação 3, ajustou-se relativamente bem aos dados experimentais, a exceção do termo quadrático de concentração do meio e o termo quadrático do tempo. Como o coeficiente de regressão mostrado pela Tabela 7 não apresenta um valor satisfatório, pois todos os valores de "p" encontram-se abaixo de 5% do limite de confiança a exceção dos referidos valores do termo quadrático de concentração do meio e o termo quadrático do tempo, podendo assim, o modelo ser corrigido com a exclusão dos referidos termos. O Diagrama de Pareto (Figura 4) confirma a pequena influência do termo quadrático de concentração do meio e o termo quadrático do tempo.

As respostas, demonstram que a condição que mais favoreceu ao aumento na produção de astaxantina foi o meio de milhocina, na concentração de 4%, em 96 horas, na presença de luz, porém esse resultado ainda precisa ser otimizado, pois, de acordo com a análise da superfície de resposta e na superfície de contorno, Figuras 5 a 8, pode-se inferir que o modelo precisa ser melhor ajustado aos dados experimentais. Essa necessidade de ajuste é demonstrada claramente na Figura 7, onde o paralelismo ausente demonstra uma boa interação entre os fatores e a faixa do ótimo se estende à região mais alta, representada pelo meio milhocina, na concentração de 4%, no tempo de 96 horas.

As análises dos valores simulados e experimentais para as amostras com e sem influência de luz azul, Figuras 1 e 2, respectivamente, demonstram que a condição que mais favorável ao aumento na produção de astaxantina, quando se utilizou LED's azul, foi o meio de Milhocina, na concentração de 4% em 96 horas, porém esse resultado ainda precisa ser

otimizado, pois, de acordo com a análise da superfície de resposta e na superfície de contorno, para as culturas com e sem iluminação com LEDs azul, Figuras 5 a 8, respectivamente, podemos inferir que o modelo precisa ser ajustado. A análise da superfície de contorno com as amostras iluminadas (Figura 5), o paralelismo ausente demonstra uma boa interação entre os fatores e na análise de superfície de resposta, a faixa do ótimo se estende à região mais alta, representada pela milhocina, na concentração de 4%, no tempo de 96 horas. A superfície de contorno com as amostras sem iluminação, onde o paralelismo ausente demonstra uma boa interação entre os fatores e na análise de superfície de resposta, a faixa do ótimo se estende à região mais alta, representada pela milhocina, na concentração de 4%, no tempo de 96 horas. Quando se utilizou a fonte luminosa, os resultados foram melhores, em comparação com os experimentos sem iluminação. Porém, os resultados estão longe do ponto ótimo, por isso faz-se necessária a realização de outros experimentos em busca do ponto de máxima produção de astaxantina.

Todos os resultados apresentados demonstraram que a utilização de LED's azul de forma contínua, pode aumentar significativamente o teor de astaxantina produzida pelo microrganismo *Mucor javanicus*, corroborando com o que descrevem Tada; Shiroishi, 1982, quando sugerem que a luz possa estimular a carotenogênese em fungos, e de acordo com o demonstrado em espécies de *Phycomyces* e *Xanthophyllomyces dendrorhous*, quando a luz demonstrou-se favorável para o aumento de carotenóides no micélio, através da indução luminosa (JAYARAM et al., 1979; MEYER; Du PREEZ, 1994a apud Moriel, 2005).

Analisando-se a relação entre o crescimento celular e teores do carotenóide observa-se que a produção máxima de astaxantina demonstrada em mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi obtida quando as culturas foram iluminadas continuamente por luz, sendo a concentração final do carotenóide determinada através do tempo total de iluminação (MEYER; Du PREEZ, 1994a apud MORIEL, 2005). Quando as culturas foram iluminadas continuamente, o aumento do conteúdo de carotenóides foi acompanhado da concentração de biomassa.

Tada; Shiroishi (1978) apud Tada; Shiroishi (1982) observaram que a luz não afetou a taxa de crescimento celular, assim como o consumo de glicose e aminoácidos por *Rhodotorula minuta*. Porém, a concentração de carotenóides nas células cultivadas sob iluminação, diferiu daquelas cultivadas no escuro. As células cultivadas sob intensidade luminosa de 4.000 lux produziram 140 µg/g de carotenóides por g de célula seca, enquanto que as células crescidas no escuro apresentaram somente de 10 a 15 µg/g.

Analisando-se a relação entre o crescimento celular e teores do carotenóide observa-se que a produção máxima de astaxantina demonstrada em mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi obtida quando as culturas foram iluminadas continuamente por luz, sendo a

concentração final do carotenóide determinada através do tempo total de iluminação (MEYER; Du PREEZ, 1994 apud MORIEL, 2005). Quando as culturas fora iluminadas continuamente, o aumento do conteúdo de carotenóides foi acompanhado da concentração de biomassa.

Segundo Katsuda et al., (2004) apud Lababpour et al. (2005), LEDs que emitem baixos comprimentos de onda (380 - 470 nm), como é o caso do LEDS azul, podem induzir a mudança morfológica em *H. pluvialis* e o aumento na acumulação de astaxantina, embora a indução cause a supressão do crescimento celular, como foi observado nos experimentos realizados.

Tada; Shiroishi (1978) apud Tada; Shiroishi (1982) observaram que a luz não afetou a taxa de crescimento celular, assim como o consumo de glicose e aminoácidos por *Rhodotorula minuta*. Porém, a concentração de carotenóides nas células cultivadas sob iluminação, diferiu daquelas cultivadas no escuro. As células cultivadas sob intensidade luminosa de 4.000 lux produziram 140 µg/g de carotenóides por g de célula seca, enquanto que as células crescidas no escuro apresentaram somente de 10 a 15 µg/g.

Como a astaxantina é uma molécula rica em carbono, provavelmente uma estimulação deste carotenóide certamente pode levar a um redirecionamento de carbono disponível para a síntese de biomassa conforme os estudos de Meyer; Du Preez (1994b) apud Andrade (2003). Isto explicaria a diminuição de biomassa ao mesmo tempo em que ocorre o aumento dos rendimentos de astaxantina.

Provavelmente, existe uma faixa ótima de intensidade luminosa ideal para maximizar a produção de pigmento, portanto, os valores ideais mostraram-se dependentes das condições de cultivo, coincidindo com as constatações de Meyer; Du Preez (1994) apud Andrade (2003)

A utilização de rejeitos industriais como a milhocina e a quirera, poluidores ambientais possuem potencial para a produção de astaxantina. A milhocina aumentou a produção de astaxantina, principalmente na concentração de 4% e a quirera na concentração de 4% e assim como utilização da combinação de milhocina com quirera foi favorável à produção de astaxantina, principalmente na concentração de 7%. A luz azul interfere diretamente na síntese de astaxantina. As análises no Statistica 5.0, demonstram que os resultados obtidos são o primeiro passo para uma otimização da produção de astaxantina pelos meios econômicos utilizados, entretanto outros estudos são necessários para obtenção da produtividade máxima de astaxantina por *M. javanicus*.

AGRADECIMENTOS

Ao autores agradecem à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao PROMATA e à FACEPE pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki, G. M. (2000) A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. In ANDRADE, S. A. (2003). *Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)*. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Andrade V.S. (2003). *Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)*. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Andrews, A. G.; Phaff, H. J.; Starr, M. P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15:1003-1007.
- Ausich, R. L. (1997). Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure & Applied Chemistry*. 69 (10): 2169-2173.
- Batra, P. P. (1971). Mechanism of light-induced Carotenoid synthesis in nonphotosynthetic plants. *Photophysiol*. In LAMPILA, L. E.; WALLEN, S. E.; BULLERMAN, L. B. (1985). A review of factors affecting biosynthesis of carotenoids by the order *Mucorales*. *Mycopathologia*. 90:65-80.
- Britton, G. (1985). General carotenoids. [S.l.] In DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUNÓZ, J. A. (2004). Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Applied Microbiology Biotechnology*. 66:249-252.
- Britton, G. (2004). Structure and properties of carotenoids in relation to function. In FASEB J. vol. 9, 15151-1558, *Methods in Enzymology*. Nº 213, p. 3-13, 1992. In ZEB, A.; MEHMOOD, S.; Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. *Pakistan Journal of Nutritional*. 3 (3):191-204.
- Domínguez-Bocanegra, A. R.; Torres-Munóz, J. A. (2004). Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Applied Microbiology Biotechnology*. 66:249-252.
- Fraser, P. D.; Ruiz-Hidalgo, M. J. Lopez-Matas, M. A. (1996). Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 289: 203-208.
- Fuente, J. C.; Oyarzún, B.; Quezada, N.; Valle, J. M. (2006) Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, 24:90-95.
- Gong, X.; Chen, F. (1998). Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. In ANDRADE, S. A. (2003). *Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)*. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Gross, G. J.; Lockwood, S. F. (2004). Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (*Cardax*TM). *Life Sciences*. 75: 215-224.

Haard, N. F. (1988). Astaxanthin formation by yeasts on molasses. In MALDONADE, I., R. (2003). *Produção de carotenóides por leveduras*. 293 p. Campinas, São Paulo. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Hayman, G. T.; Mannarelli, B. M.; Leathers, T. D. (1995). Productions of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. [S.l.]. In MALDONADE, I., R. (2003). *Produção de carotenóides por leveduras*. 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Hernández, F. I. L., et al. (2002). Avaliação da Composição de Vários Alimentos e Determinação da Cinética Ruminal da Proteína, Utilizando o Método de Produção de Gás e Amônia *in Vitro*¹. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 31(1): 243-255.

Hesseltine, C. W.; Featherston, C. L.; Lombard, G. L.; Dowell Jr., V. R. (1985). Anaerobic growth of molds isolated from fermentation starters used for foods in Asian countries. *Mycologia*. In ORLOWSKI, M. (1991). *Mucor Dimorphism. Microbiological Reviews*. 55 (2): 234-258.

HESELTINE, C. W., ANDERSON, R. F. (1957). Microbiological Production of Carotenoides I. Zygosporangium and Carotene Produced by Intraspecific and Interspecific Crosses of Choanephoraceae in Liquid Media. *Mycology*. 49: 449-452.

Hiramatsu, R.; Aikawa, J.; Horinouchi, S. Beppu, T. (1989). Secretion by yeast of the zymogen form of *Mucor rennin*, an aspartic proteinase of *Mucor pusillus*, and its conversion to the nature form. *Journal Biological Chemistry*. 264:16862 -16866.

Jayaram, M., Presti, D., Delbruck, M. (1979). Light induced carotene synthesis in *Phycomyces*. *Exp. Mycol*. 3: 42-52.

Johnson, E. A.; Conklin, D. E.; Lewis, M. J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Genetic Microbiology*. 115: 173-183.

Johnson. E. A.; An, G. H. (1991). Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*. 11:225-236.

Johnson. E. A. Schroeder, W. A. (1995). Microbial carotenoids. *Advances in Biochemical Engineering*. 53: 119-178.

Kaewpintong, K; Shotipruk, A.; Powtongsook, S.; Pavasant, P. (2006). Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*. 1-8.

Katsuda, T. Lababpour, A. Shimahara, K.; Katoh, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. In LABABPOUR, A.; HADA, K.; SHIMAHARA, K.; KATSUDA, T.; KATOH, S. (2004). Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98 (6): 452-456.

Meyer, P. S., Du Preez, J. C. (1994). Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants System. *Journal General Applied Microbiology*. 17: 24-31.

Ramírez, J.; Gutierrez, H.; Gschaedler, A. (2001). Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *Journal of Biotechnology*. 88: 259-268.

Ruiz-Hidalgo, M. J.; Eslava, A. P.; Alvarez, M. I.; Benito, R. P. Heterologous expression of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase gene (*CarB*) in *Mucor circinelloides*. (1999). In ANDRADE, S. A. *Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales)*. (2003). 145 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Shih, C T.; Hang, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. Lenbesm. (1996). In MALDONADE, I., R. *Produção de carotenóides por leveduras*. (2003). 293 p. Campinas São Paulo. 293 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Storebakken, T., No, K. H. (1992). Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*. N. 100, p. 209-229

Tada, M.; Shiroish, M. (1982). *The influence of light illumination on the growth and carotenoid formation of Rhodotorula minuta*. *Science Agricultural Okayama University*. V. 50, p. 63-68, 1978. TADA, M.; SHIROISH, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* V. Photoinduction of 3-hydroxy-3-methyl Glutaryl coenzyme A reductase. *Plant & Cell Physiology*. 23 (4): 615-621.

Tada, M.; Shiroish, M. (1982). Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* V. Photoinduction of 3-hydroxy-3-methyl Glutaryl coenzyme A reductase. *Plant & Cell Physiology*. 23 (4): 615-621.

Tabela 1: Resultados experimentais de produção da variável dependente astaxantina produzida por *Mucor javanicus* crescido no meio de cultura Hesseltine e Anderson

Tempo (h)	Sob Influência de LEDs azul		Ausência de Luz	
	Biomassa (g/L)	Astaxantina ($\mu\text{g/g}$)	Biomassa (g/L)	Astaxantina ($\mu\text{g/g}$)
48	2,8	21,4	2,8	12,7
72	2,9	34,1	3,8	23,0
96	3,2	37,7	4,3	26,7

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial 3^3 utilizado para uma triagem de três fatores na produção de astaxantina por *Mucor javanicus*, para culturas iluminadas com Leds azul e sem iluminação

Experimento	M ^a	C ^b	T ^c
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	0
3	-1	-1	+1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6	-1	0	+1
7	-1	+1	-1
8	-1	+1	0
9	-1	+1	+1
10	0	-1	+1
11	0	-1	0
12	0	-1	-1
13	0	0	+1
14	0	0	-1
15	0	+1	+1
16	0	+1	0
17	+1	+1	-1
18	+1	-1	-1
19	+1	-1	0
20	+1	-1	+1
21	+1	0	-1
22	+1	0	0
23	+1	0	+1
24	+1	+1	-1
25	+1	+1	0
26	+1	+1	+1
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0

Legenda:

^aMeio utilizado: Milhocina no nível -1, Milhocina com quirera no nível 0, Quirera no nível +1.

^bConcentração do meio: 4% no nível -1; 7% no nível 0 e 10% no nível +1.

^cTempo de cultivo: 48 horas no nível -1, 72 horas no nível 0 e 96 horas no nível +1.

Tabela 4: ANOVA para a variável resposta produção de astaxantina submetida a iluminação com Leds azul

Efeito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	F-calculado	Valor de P
(1) Meio (L) *	4633,071	1	4633,071	117,9197	0,000000
Meio (Q) *	200,684	1	200,684	5,1077	0,028299
(2) % Meio (L) *	221,861	1	221,861	5,6467	0,21440
% Meio (Q) *	529,360	1	529,360	13,4731	0,000597
(3) Tempo (L) *	288,773	1	288,773	7,3498	0,009221
Tempo (Q)	81,567	1	81,567	2,0760	0,155989
Erros	1925,213	49	39,290	-	-
Total (corrigidos)	7854,262	55	-	-	-

*valores de p abaixo de 5%; $R^2 = 0,75488$; $R^2_{ajustado} = 0,72487$ (para g.l.); g.l. = graus de liberdade.

Tabela 5: Coeficiente de regressão para a variável resposta produção de astaxantina submetida a iluminação com Leds azul

Efeito	Soma quadr.	Média quadr.	t (49)	p	-95% lim. de conf.	+95% lim. de conf.
Mean/Intero	23,2812	2,011110	11,5763	0,000000	19,2397	27,32265
(1) Meio (L) *	-11,3444	1,044696	-10,8591	0,000000	-13,4438	-9,24505
Meio (Q) *	3,9674	1,755441	2,2600	0,28299	0,4397	7,49504
(2) % Meio (L) *	-2,4825	1,044696	-2,3763	0,21440	-4,5819	-0,38310
% Meio (Q)	-6,4435	1,755441	-3,6706	0,00597	-9,9712	-2,91579
(3) Tempo (L) *	2,8322	1,044696	2,7110	0,009221	0,7328	4,93162
Tempo (Q)	-2,5393	1,755441	-1,4408	0,155989	-6,0570	0,99838

*valores de p abaixo de 5%; $R^2 = 0,75488$; $R^2_{ajustado} = 0,72487$

Tabela 6: ANOVA para a variável resposta produção de astaxantina produzida por *Mucor javanicus* crescido sem interferência de luz

Efeito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	F-calculado	Valor de P
(1) Meio (L) *	525,938	1	525,9378	17,62728	0,000013
Meio (Q) *	199,673	1	199,6732	6,69223	0,012703
(2) % Meio (L) *	141,214	1	141,2136	4,73290	0,034444
% Meio (Q)	29,291	1	29,2906	0,98170	0,326647
(3) Tempo (L) *	143,600	1	143,6003	4,81289	0,033021
Tempo (Q)	36,805	1	36,8050	1,23355	0,272138
Erros	1461,993	49	29,8366	-	-
Total (corrigidos)	2566,970	55	-	-	-

*valores de p abaixo de 5%; $R^2 = 0,43046$; $R^2_{ajustado} = 0,36072$ (para g.l.); g.l. = graus de liberdade.

Tabela 7: Coeficiente de regressão para a variável resposta produção de astaxantina sem interferência de luz

Efeito	Soma quadr.	Média quadr.	t (49)	p	-95% lim. de conf.	+95% lim. de conf.
Mean/Intero	19,68382	1,752545	11,23157	0,000000	16,16195	23,20569
(1) Meio (L) *	-3,82222	0,910381	-4,19849	0,000113	-5,65170	-1,99274
Meio (Q) *	-3,95735	1,529747	-2,58693	0,012703	-7,03149	-0,88321
(2) % Meio (L) *	-1,98056	0,910381	-2,17552	0,34444	-3,81004	-0,15108
% Meio (Q)	-1,51569	1,529747	-0,99081	0,326647	-4,58983	1,55845
(3) Tempo (L) *	1,99722	0,910381	2,19383	0,33021	0,16774	3,82670
Tempo (Q)	-1,69902	1,529747	-1,11065	0,272138	-4,77316	1,37512

*valores de p abaixo de 5%; $R^2 = 0,43046$; $R^2_{ajustado} = 0,36072$

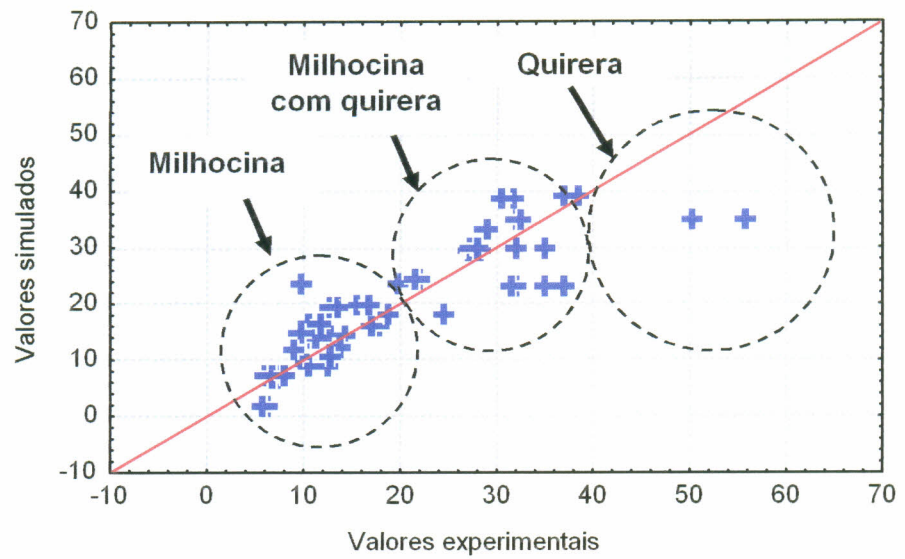


Figura 1: Valores simulados e experimentais da variável astaxantina produzida por culturas de *Mucor javanicus* submetidas a Leds azul.

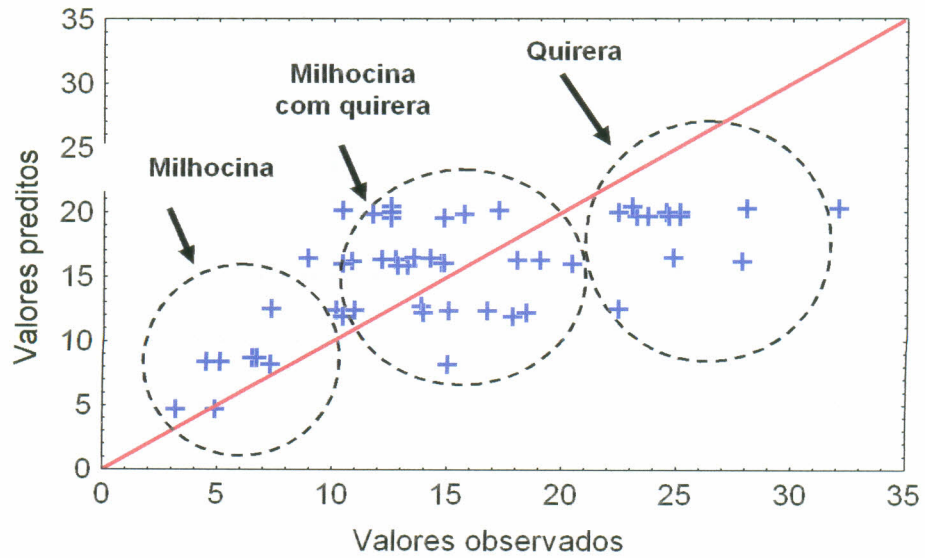


Figura 2: Valores simulados e experimentais da variável astaxantina produzida por culturas de *Mucor javanicus* crescidas na ausência de luz.

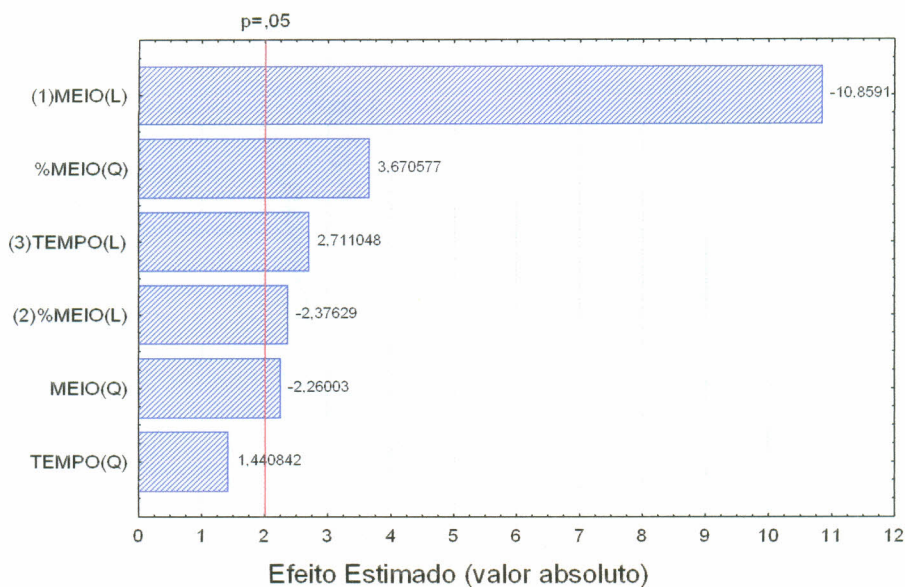


Figura 3: Diagrama de Pareto da variável astaxantina, produzida por *Mucor javanicus*, submetida a iluminação com Leds azul

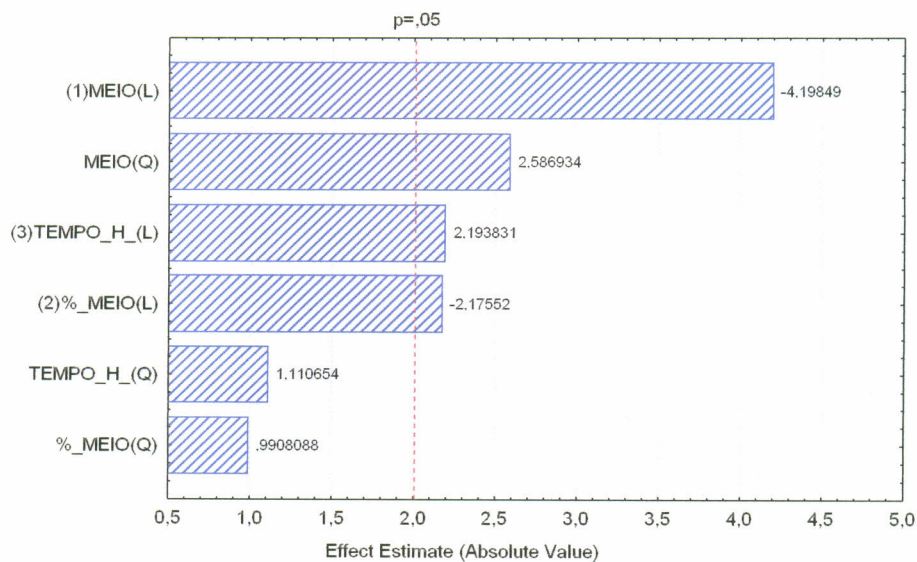


Figura 4: Diagrama de Pareto da variável astaxantina produzida por *Mucor javanicus*, na ausência de luz.

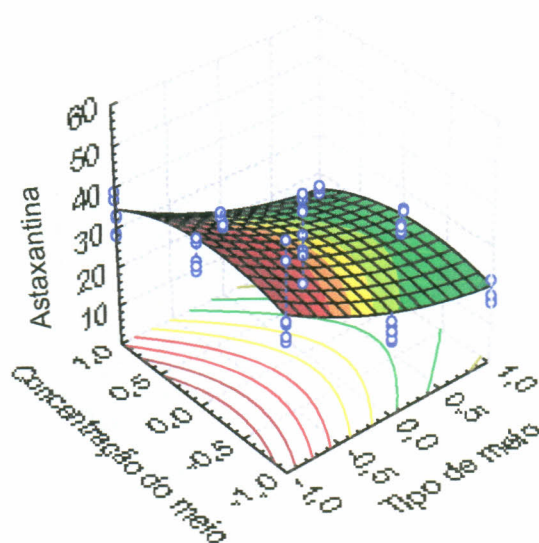


Figura 5: Superfície de resposta de astaxantina produzida por culturas de *Mucor javanicus* submetidas a Leds azul

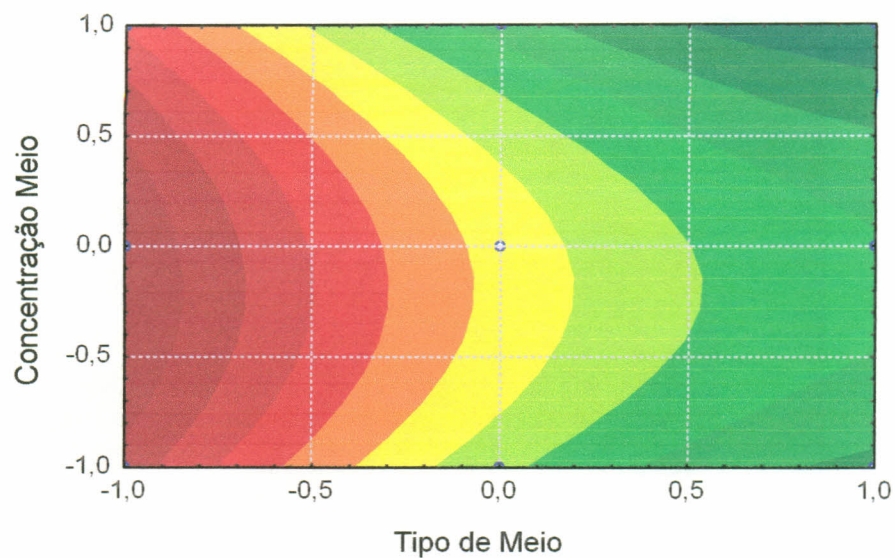


Figura 6: Superfície de contorno do modelo da variável resposta astaxantina em culturas de *Mucor javanicus* crescidas sob influência de LEDs azul

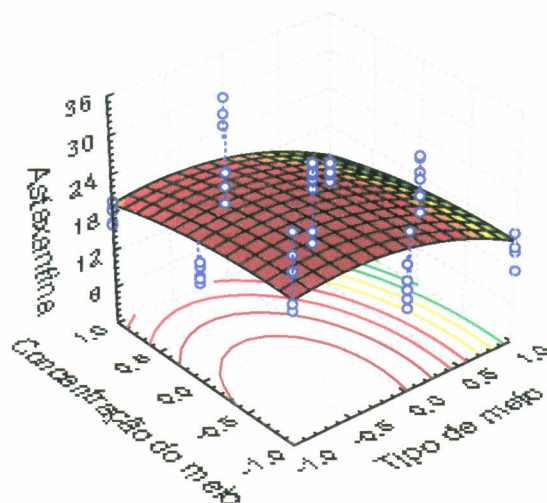


Figura 7: Superfície de resposta de astaxantina em culturas de *Mucor javanicus* crescidas na ausência de luz

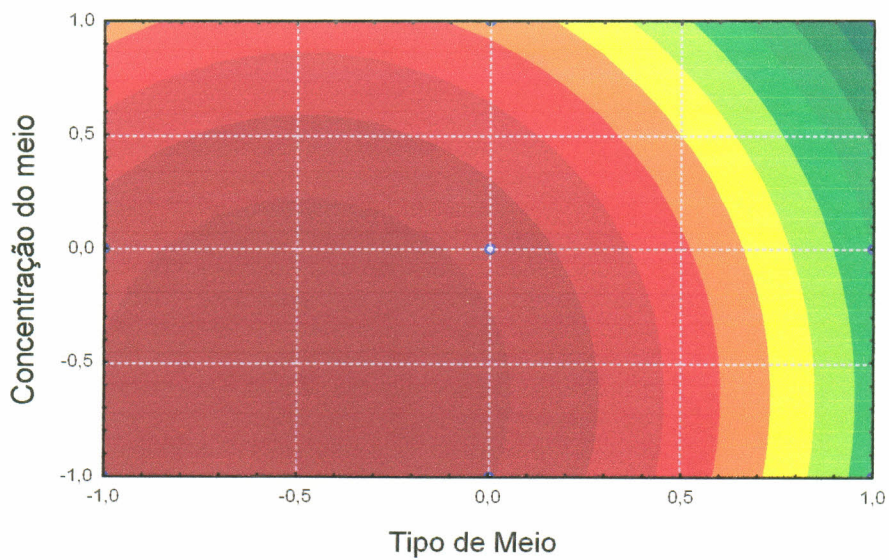


Figura 8: Superfície de contorno do modelo da variável resposta astaxantina em culturas de *Mucor javanicus* crescidas na ausência de luz.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- A utilização de rejeitos industriais como a milhocina e a quirera, poluidores ambientais possuem potencial para a produção de astaxantina;
- A milhocina aumentou a produção de astaxantina, principalmente na concentração de 4%;
- A milhocina aumentou a produção de astaxantina, principalmente na concentração de quirera na concentração de 4%;
- A combinação de milhocina com quirera foi favorável à produção de astaxantina, principalmente na concentração de 7%;
- A luz azul interfere diretamente na síntese de astaxantina;
- As análises no Statistica 5.0, demonstram que os resultados obtidos são o primeiro passo para uma otimização da produção de astaxantina pelos meios econômicos utilizados, entretanto outros estudos são necessários para obtenção da produtividade máxima de astaxantina por *M. javanicus*.
- As análises realizadas no Statistica 5.0, demonstram que os resultados obtidos são o primeiro passo para uma otimização da produção de astaxantina pelos meios econômicos utilizados.

ANEXOS

Instruções Revista Food Biotechnology

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Aims and Scope: *Food Biotechnology* is an international, peer-reviewed journal that is focused on recent developments and applications of modern genetics as well as enzyme, cell, tissue, and organ-based biological processes to produce and improve foods, food ingredients, and functional foods. Other areas of strong interest are manuscripts that focus on fermentation to improve foods, food ingredients, functional foods, and food waste remediation. In addition, modern molecular and biochemical approaches to improving food safety are strongly encouraged.

Address manuscripts to the Editor: Kalidas Shetty, Laboratory of Food Biotechnology, Dept. of Food Science, University of Massachusetts, Amherst, MA USA. 01003. E-mail: kalidas@foodsci.umass.edu

Authors are strongly encouraged to submit manuscripts on disk. The disk should be prepared using MS Word or WordPerfect and should be clearly labeled with the authors' names, file name, and software program. A hardcopy printout that exactly matches the disk must be supplied. Each manuscript must be accompanied by a statement that it has not been published elsewhere and that it has not been submitted simultaneously for publication elsewhere. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources and are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. All parts of the manuscript should be typewritten, double-spaced, with margins of at least one inch on all sides. Number manuscript pages consecutively throughout the paper. Authors should also supply a shortened version of the title suitable for the running head, not exceeding 50 character spaces. Each article should be summarized in an abstract of not more than 100 words and a list of keywords should be included. Avoid abbreviations, diagrams, and reference to the text in the abstract.

References. Cite in the text by author and date (Smith, 1983). Prepare reference list in accordance with the APA Publication Manual, 4th ed. Examples:

Journal: Hecker, M., Volker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb. Physiol.* 44:35-91.

Book: Harold, F. (1986). *The vital force: A study of bioenergetics*. New York: Freeman.

Contribution to a Book: Eggeling, L., Sahm, H., de Graaf, A. A. (1996). Quantifying and directing metabolic flux: Application to amino acid overproduction. In: Scheper, T., ed. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol. 54, 1-30.

Illustrations. Illustrations submitted (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be clean originals or digital files. Digital files are recommended for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in text files

Color illustrations will be considered for publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in their printing and publication. The charge for the first page with color is \$900.00. The next three pages with color are \$450.00 each. A custom quote will be provided for color art totaling more than 4 journal pages. Good-quality color prints should be provided in their final size. The publisher has the right to refuse publication of color prints deemed unacceptable.

Tables and Figures. Tables and figures (illustrations) should not be embedded in the text, but should be included as separate sheets or files. A short descriptive title should appear above each table with a clear legend and any footnotes suitably identified below. All units must be included. Figures should be completely labeled, taking into account necessary size reduction. Captions should be typed, double-spaced, on a separate sheet. All original figures should be clearly marked in pencil on the reverse side with the number, author's name, and top edge indicated.

Proofs. Page proofs are sent to the designated author using Taylor & Francis' EProof system. They must be carefully checked and returned within 48 hours of receipt.

Offprints/Reprints. The corresponding author of each article will receive one complete copy of the issue in which the article appears. Offprints of an individual article may be ordered from Taylor & Francis. Use the offprint order form included with page proofs. Up to 10 additional issue copies may also be ordered. If offprints are not ordered by the required date, reprint pricing goes into effect, and issue copies may not be ordered.