



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

TESE DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* UTILIZANDO
O HIDROLISADO DO SISAL (*Agave sisalana*) COMO SUBSTRATO**

João Pessoa - PB

2020

JOSEVAN DA SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* UTILIZANDO
O HIDROLISADO DO SISAL (*Agave sisalana*) COMO SUBSTRATO**

João Pessoa - PB

2020

JOSEVAN DA SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* UTILIZANDO
O HIDROLISADO DO SISAL (*Agave sisalana*) COMO SUBSTRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

João Pessoa - PB

2020

S586p Silva, Josevan da.

Produção de biocompostos por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando o hidrolisado do sisal (*Agave sisalana*) como substrato / Josevan da Silva. - João Pessoa, 2020.

101 f. : il.

Orientação: Flávio Luiz Honorato da Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Fibra do sisal. 2. Bagaço do sisal. 3. Levedura oleaginosa. 4. Lipídios. 5. Carotenoides. I. Flávio Luiz Honorato da Silva. II. Título.

UFPB/BC

JOSEVAN DA SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* UTILIZANDO
O HIDROLISADO DO SISAL (*Agave sisalana*) COMO SUBSTRATO**

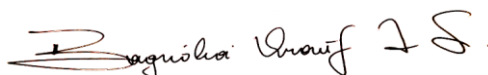
BANCA EXAMINADORA



Prof^o Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

DEQ/CT/UFPB

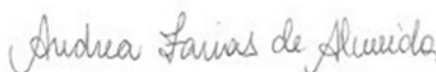
- Orientador -



Prof^a Dr.^a Bagnólia Araújo Costa

DCF/CCS/UFPB

- Examinadora interna -



Prof^a Dr.^a Andrea Farias de Almeida

DB/CBIOTEC/UFPB

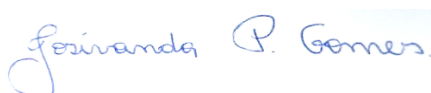
- Examinadora interna -



Prof^o Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

DEQ/CT/UFPB

- Examinador interno -



Prof^a Dr.^a Josivanda Palmeira Gomes

CTRN/UFCG

- Examinadora externa -

A minha mãe, Severina Francisca da Conceição, ao meu pai José Alves da Silva (*“in memorian”*) e minha avó Otávia Maria Francisca da Conceição (*in memoriam*), dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível.

A minha mãe, Severina Francisca da Conceição, por todo amor, apoio, incentivo, carinho e compreensão.

Ao meu pai, José Alves da Silva (*in memoriam*), e minha avó Otávia Maria da Conceição (*in memoriam*), por terem me guiado e dado forças, mesmo sem estarem presentes fisicamente durante toda essa jornada.

A toda minha família, pelas palavras de incentivo e por todo apoio.

Ao professor Flávio Luiz Honorato da Silva, pela orientação, paciência, confiança, companheirismo, amizade, compreensão, incentivo, transmissão de conhecimentos e todo apoio, fundamentais nessa caminhada.

A minha namorada, Denise Nascimento, por todo carinho e apoio.

Aos meus companheiros de laboratório e amigos: Leanderson Túlio, Bruna Figueiredo, Carolina Zaninni, Felipe Augusto, Rian Nóbrega, Lorena Lucena, Débora Jamila e José Evangelista por toda colaboração, amizade, companheirismo e incentivo durante esses quatro anos.

Ao Técnico do Laboratório de Operações Unitárias - DEQ Rafael Peixoto, por todo o apoio durante o uso do laboratório.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela companhia e momentos vivenciados.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia/DEQ/UFPB.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA/DEA/UFPB).

Aos professores membros das bancas de qualificação e de defesa: Prof.^a Dr^a Bagnólia, Prof.^a Dr^a Josivanda Palmeira, Prof.^a Dr^a Andrea Almeida, Prof.^o Dr Carlos Bispo, pela disponibilidade, aprendizado e contribuições para a tese;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por todo aprendizado durante o curso de Doutorado.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fernanda Feitosa e Lindalva Nóbrega, e ao secretário Gerardo Neto, pelo apoio prestado.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o curso;

Aos alunos de iniciação científica do curso de Engenharia Química: Wylliam Costa, Ellen Alves e Ysrrael Simões, pelo apoio durante a pesquisa.

À Fundação André Tosello (FAT) localizada em Campinas/SP que forneceu a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, fundamental para este estudo.

A todos que participaram diretamente e indiretamente dessa conquista.

MUITO OBRIGADO!

***“Tudo que um sonho precisa para ser realizado é
alguém que acredite que ele possa ser realizado”.***

Roberto Shinyashiki

RESUMO

A busca por fontes alternativas de biocompostos com potencial para aplicação em diversos setores da indústria tem sido intensa nos últimos anos. Em vista disso, leveduras oleaginosas com a capacidade de acumular carotenoides e lipídios no interior de suas células, têm sido bastante estudadas. Objetivou-se nesse estudo avaliar o potencial dos hidrolisados da fibra e do bagaço do sisal como substratos para a produção de lipídios e carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. As células de levedura foram inoculadas no hidrolisado de fibra e do bagaço do sisal, as culturas foram incubadas em um agitador orbital a 30 °C e 200 rpm. Durante o intervalo de 120 h, foram quantificados a biomassa e os açúcares redutores. Para a determinação das variáveis que mais influenciam no cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizando-se o hidrolisado do bagaço do sisal como substrato, foi realizado um planejamento Plackett-Burman com oito variáveis de entrada: KH_2PO_4 (g/L), MgSO_4 (g/L), temperatura (°C), pH inicial, extrato de levedura (g/L), CaCl_2 (g/L), $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (g/L) e NaCl (g/L) e três variáveis respostas: biomassa (g/L), produção específica de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) e produção volumétrica de carotenoides (g/L), totalizando quinze experimentos. Foram produzidos 4,98 g/L de biomassa, 19,28 g/100 g de lipídios e 0,48 mg/L de carotenoides, utilizando-se o hidrolisado da fibra como substrato. A produção de carotenoides pela levedura mostrou-se influenciada principalmente pela temperatura e pelo pH, sendo a biomassa máxima obtida em temperatura de 34,0 °C e pH de 5,0, e a síntese de carotenoides máxima em temperatura de 22,0 °C e pH de 7,0. A levedura cresceu e acumulou carotenoides e lipídios utilizando-se o hidrolisado da fibra e do bagaço do sisal como substratos, sendo produzidos, como valores máximos, 4,98 g/L de biomassa, 19,28% de lipídios e 0,49 mg/L de carotenoides, usando-se a fibra e 12,87 g/L de biomassa, 0,54 g de lipídios/L de substrato e 1,13 g/L de carotenoides, utilizando-se o bagaço. No perfil de ácidos graxos do óleo obtido houve predominância de insaturados, principalmente oleico e linoleico. Os hidrolisados da fibra e do bagaço de sisal demonstraram ser meios adequados para a produção de lipídios e carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Os materiais lignocelulósicos estudados apresentam potencial para geração de hidrolisados que podem ser usados como substrato para o cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, visando à obtenção de biocompostos, possibilitando agregação de valor ao resíduo (bagaço) e à fibra, além da minimização dos impactos ambientais provocados pelo descarte inadequado, com potencial para aplicação no setor alimentício, químico, farmacêutico e de cosméticos.

Palavras-chave: Fibra do sisal – Bagaço do sisal – Levedura oleaginosa – Lipídios – Carotenoides

ABSTRACT

The search for alternative sources of biocomposites with potential for application in several sectors with the ability to accumulate carotenoids and lipids inside their cells, have been extensively studied. The aim of this study was to evaluate the potential of sisal fiber and sisal pulp hydrolysates as substrates for the production of lipids and carotenoids by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. The yeast cells were inoculated into the fiber hydrolyzate and sisal pulp, the cultures were incubated in an orbital shaker at 30 °C and 200 rpm. During the 120 h interval, biomass and reducing sugars were quantified. In order to determine the variables that most influence the cultivation of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, using sisal bagasse hydrolyzate as a substrate, a Plackett-Burman planning was carried out with 8 input variables: KH_2PO_4 (g/L), MgSO_4 (g/L), temperature (°C), initial pH, yeast extract (g/L), CaCl_2 (g/L), $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (g/L) and NaCl (g/L) and 3 response variables : biomass (g/L), specific production of carotenoids ($\mu\text{g/g}$) and volumetric production of carotenoids (g/L), totaling 15 assays. Were produced 4.98 g/L of biomass, 19.28 g/100 g of lipids and 0.48 mg/L of carotenoids, using the sisal fiber hydrolyzate as a substrate. The yeast carotenoid production was mainly influenced by temperature and pH, with maximum biomass obtained at 34.0 °C and pH 5.0, and maximum carotenoid synthesis at 22.0 °C and pH of 7.0. The yeast grew and accumulated carotenoids and lipids using fiber and sisal pulp hydrolyzate as substrates, producing as maximum values 4.98 g/L of biomass, 19.28% of lipids and 0.49 mg/L of carotenoids, using fiber and 12.87 g/L of biomass, 0.54 g of lipids/L of substrate and 1.13 g/L of carotenoids, using sisal pulp. In the fatty acid profile of the oil obtained, there was a predominance of unsaturated, mainly oleic and linoleic. The hydrolyzates of fiber and sisal pulp proved to be an adequate means for the production of lipids and carotenoids by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. The lignocellulosic materials studied have potential to generate hydrolyzates that can be used as a substrate for the cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* yeast, aiming at obtaining biocomposites, allowing added value to the residue (sisal pulp) and fiber, in addition to minimizing the environmental impacts caused due to improper disposal, with potential for application in the food, chemical, pharmaceutical and cosmetics sectors.

Key-word: Sisal fiber – Sisal pulp – Oleaginous yeast – Lipids – Carotenoids

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Produção de lipídios utilizando a levedura <i>R. mucilaginosa</i>	31
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção e exportação do sisal ao longo dos últimos anos.....	22
Figura 2. Processo de produção de fibras do sisal	24
Figura 3. Fibra do sisal após secagem	38
Figura 4. Bagaço do sisal após secagem	39
Figura 5. Balança termogravimétrica utilizada na análise	39
Figura 6. Autoclave utilizada para a realização das hidrólises do bagaço e da fibra do sisal	40
Figura 7. Hidrolisado do bagaço do sisal	41
Figura 8. Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado na quantificação de açúcares e inibidores dos hidrolisados da fibra e do bagaço do sisal	43
Figura 9. Levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> reativada	44
Figura 10. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> em placa de Petri	45
Figura 11. Hidrolisado do bagaço do sisal	47
Figura 12. Hidrolisado do bagaço do sisal após adsorção	47
Figura 13. Lipídios extraídos da levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> dissolvidos em clorofórmio.....	48
Figura 14. Biomassa de <i>R. mucilaginosa</i> seca e macerada	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Panorama da produção do sisal na Bahia, Paraíba, Nordeste e Brasil.....	22
Tabela 2. Exportação do sisal no Brasil (em 1000 ton) no 1º semestre de 2018	23
Tabela 3. Composição química da fibra do sisal	25
Tabela 4. Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^2	40
Tabela 5. Composição do meio YMA (<i>Yeast Malt Agar</i>)	44
Tabela 6. Matriz do planejamento experimental Placket-Burman com valores reais e codificados	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 RESÍDUOS OU SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS.....	19
3.2 SISAL	20
3.2.1 Fibra do sisal	23
3.2.2 Resíduos gerados na produção da fibra do sisal	25
3.3 LEVEDURAS OLEAGINOSAS	25
3.3.1 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>.....	27
3.4 LIPÍDIOS.....	28
3.4.1 Produção biotecnológica de lipídios	30
3.4 CAROTENOIDES	31
3.5.1 Produção biotecnológica de carotenoides	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 MATÉRIA-PRIMA	38
4.1.1 Tratamento da matéria-prima	38
4.2 CARACTERIZAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA DA FIBRA E DO BAGAÇO DO SISAL	39
4.3 HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	40
4.4 QUANTIFICAÇÕES DOS AÇÚCARES E INIBIDORES PRESENTES NOS HIDROLISADOS DA FIBRA E DO BAGAÇO DO SISAL	41
4.4.1 Açúcares redutores e totais	42
4.4.2 Perfil de açúcares: análise qualitativa	42
4.5 PRODUÇÃO DOS HIDROLISADOS DA FIBRA E DO BAGAÇO DO SISAL	43
4.6 MICRORGANISMO	43
4.7 CULTIVO PILOTO UTILIZANDO-SE OS HIDROLISADOS DA FIBRA DO SISAL.....	45
4.8.1 Biomassa.....	46
4.9 DETOXIFICAÇÃO DO LICOR HEMICELULÓSICO	46

4.10 PRODUÇÃO DE BIOMASSA, LIPÍDIOS E CAROTENOIDES UTILIZANDO-SE O HIDROLISADO DO SISAL DETOXIFICADO E A LEVEDURA <i>R. Mucilaginosa</i>	47
4.10.1 Biomassa	47
4.10.2 Consumo do substrato	49
4.10.3 Lipídios totais	49
4.10.4 Determinação do perfil de ácidos graxos	49
4.10.5 Carotenoides totais	49
4.11 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKET-BURMMAN	50
4.12 COEFICIENTES DE RENDIMENTO	52
REFERÊNCIAS	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÕES	98
APÊNDICES	99

1 INTRODUÇÃO

Investimentos na gestão de resíduos industriais podem contribuir para promover a sustentabilidade de um país. O reaproveitamento de subprodutos, resíduos e efluentes para a produção, por processos biotecnológicos, de substâncias importantes configura-se como uma excelente alternativa econômica, social e ambiental, possibilitando a produção de agentes antioxidantes, agentes antimicrobianos, vitaminas, enzimas, lipídios, celulose, amido, proteínas e pigmentos (FEDERICI et al., 2009; MUSSATTO et al., 2010; LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; WYMAN, 2003).

O sisal (*Agave sisalana*) é uma planta característica do Nordeste brasileiro, cujas folhas são de grande interesse econômico, principalmente para a produção de fibras. Apenas 4% das folhas são usadas para produzir fibras e o restante não tratado, considerado resíduo, é despejado diretamente no ambiente, aumentando a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), o que provoca danos sobre a fauna e flora dos corpos hídricos (MARAN; PRIYA, 2015). A fibra do sisal apresenta alto teor de celulose e contém cerca de 90% de material que pode ser convertido em compostos utilizáveis por microrganismos (DEBNATH et al., 2010).

Uma alternativa para o reaproveitamento de um desses resíduos, o bagaço, é o uso do mesmo para a produção de biocompostos utilizando leveduras, já que alguns microrganismos são capazes de converter uma fonte de carbono, quando em excesso, em biocompostos no interior de suas células. Dentre estes microrganismos, leveduras unicelulares, desprovidas de endotoxinas e que possibilitem o cultivo em grande escala são mais interessantes para a biotecnologia, principalmente para a produção de lipídios e carotenoides (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Os lipídios microbianos podem ser produzidos utilizando-se substratos pouco onerosos e apresentam muitas vantagens quando comparados aos óleos obtidos de plantas como ciclo de vida mais curto, requerimento de menos mão de obra, não são afetados pelo local, clima, estação, possibilidade de produção em sistemas fechados e ampliação de escala. Além disso, óleos microbianos contêm grandes quantidades de ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1) configurando-se como alvos potenciais devido as propriedades interessantes, além de possuir melhor estabilidade oxidativa (THIRU; SANKH; RANGASWAMY, 2011; LIANG; JIANG, 2013; MENG et al., 2009).

Os carotenoides são outros biocompostos que podem ser obtidos por processos biotecnológicos, que devido às suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, estimulantes de resposta imune e corantes, são bastante utilizados na indústria química,

farmacêutica, de cosméticos, de alimentos e de rações (BHOSALE; BERNSTEIN, 2004; CUTZU et al., 2013). Compreendem um grupo de mais de 600 moléculas que podem ser encontradas em várias formas de vida. São importantes pigmentos naturais, produzidos por uma grande variedade de microrganismos e plantas (MAROVA et al., 2012).

Poucos estudos têm sido realizados com o bagaço do sisal, dessa forma, a literatura apresenta de forma bem sucinta, tornando-se necessários trabalhos que proponham possibilidades de aproveitamento deste resíduo, uma vez que somente a fibra tem seu destino definido. O reaproveitamento do bagaço poderá originar substâncias de interesse de da indústria química, farmacêutica, de alimentos, de cosméticos, dentre outras, agregando valor ao material e fortalecendo a economia do sisal, podendo vir a competir com os análogos sintéticos produzidos (FIGUEIROA, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir lipídios e carotenoides utilizando-se os hidrolisados da fibra e do bagaço do sisal como substratos e a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* como agente das biotransformações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização termogravimétrica (umidade, cinzas, celulose, hemicelulose e lignina) da fibra e do bagaço do sisal;
- Quantificar o teor de açúcares redutores e totais e os inibidores dos licores pré-hidrolisados da fibra e do bagaço do sisal;
- Identificar as variáveis que mais influenciam no processo de produção de lipídios e carotenoides;
- Separar e quantificar os lipídios e carotenoides produzidos;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos dos lipídios produzidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESÍDUOS OU SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

O processamento de matérias-primas provenientes da agroindústria origina toneladas de resíduos orgânicos e ou subprodutos, os quais constituem excelentes materiais para produção de substratos de grande importância social e econômica (CORREA et al., 2019). Na maioria das vezes, esses resíduos (subprodutos) contêm vários nutrientes da matéria-prima de origem, como por exemplo, carbono, nitrogênio, minerais, entre outros (RODRIGUES et al., 2014; XUE et al., 2010).

Segundo Santos et al. (2013), a elevação da exploração dos recursos naturais devido à evolução da industrialização e os avanços consideráveis no agronegócio resultaram em um grande acúmulo de resíduos no meio ambiente. Estes apresentam composição bastante diversificada, podendo ser orgânicos ou inorgânicos, e na maioria das vezes formados por uma estrutura complexa.

As estratégias e práticas relacionadas à utilização racional dos recursos naturais têm recebido mais atenção dentro do modelo de gestão ambiental, com a finalidade de minimizar os impactos causados ao meio ambiente pelos processos industriais, o gerenciamento e a reutilização de resíduos e/ou subprodutos têm sido bastante discutidos nos últimos anos (Paiva; Maria, 2018).

Visando-se o controle e melhor gerenciamento de resíduos no meio ambiente, resoluções, tais como a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 306/04, e a 388/05 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) estão sendo submetidas a constantes revisões. Diversos setores do mercado mundial têm se mobilizado em virtude da crescente preocupação com o meio ambiente. Dessa forma, várias entidades governamentais e estabelecimentos geradores de resíduos estão se preparando para adquirirem uma política ambiental que possa minimizar os impactos ambientais (PELIZER et. al., 2007).

Alguns resíduos como soro de leite e extrato de batata podem ser utilizados para a produção de biomassa e carotenoides utilizando-se leveduras vermelhas. A carência de algum nutriente essencial, seja para o desenvolvimento da levedura, ou para a síntese do carotenoide, pode ser suprida com o uso de algumas substâncias sintéticas, como o extrato de levedura, por exemplo (MAROVA et al., 2012).

O uso de resíduos e materiais de baixo valor comercial como matéria-prima para a produção de biocompostos vem se consolidando cada vez mais. Alguns desses materiais, como o bagaço do sisal, apresentam uma composição bem característica, pois os mesmos possuem em sua composição bioquímica basicamente celulose, lignina e hemicelulose em proporções que variam para cada tipo de material e época/local de cultivo (CANILHA et al., 2012).

Vários resíduos agroindustriais têm sido usados como substrato para a obtenção de lipídios e carotenoides. Soro de queijo (MAROVA et al., 2012), efluente de abatedouros (RODRIGUES et al., 2014), resíduo do processamento de tomates (CHANDI; SINGH; GILL, 2010), farinha de casca de feijão (TINOI; RAKARIYATHAM; DEMING, 2005) e borra de café (PETRIK et al., 2014), foram usados para a produção de carotenoides. Melaço de cana-de-açúcar (YAN et al., 2011; LIU et al., 2012), glicerol (O'GRADY; MORGAN, 2011; NARAYAN et al., 2005), silagem de milho (MITRA; VAN LEEUWEN; LAMSAL, 2012), efluente da aquicultura (HALFHIDE et al., 2014), permeado do soro de queijo (GIRARD et al., 2014), resíduos orgânicos da indústria ceervejeira (RYU et al., 2013), águas residuárias de queijaria (PIROZZI et al., 2013) e sabugo de milho (GAO et al., 2014) foram utilizados para a produção de lipídios.

O reaproveitamento do sisal para a obtenção de substâncias de interesse da indústria (lipídios e carotenoides) acarreta em agregação de valor ao resíduo e evita o descarte inadequado do mesmo, uma vez que substâncias originárias de processos agroindustriais podem conter várias substâncias de valor, havendo a possibilidade de serem convertidos em produtos comerciais, ou servir como matérias-primas para processos secundários, com aplicação na indústria alimentícia, química, farmacêutica e de cosméticos (LAUFENBERG, 2003).

2.2 SISAL

O sisal (*Agave sisalana*) é uma planta de origem mexicana, que normalmente atinge de 1,5 a 2 m de altura e tem sido usada principalmente para a fabricação de fios e cordas. Os produtos obtidos da fibra do sisal são amplamente utilizados na indústria marinha e na agricultura devido à resistência, durabilidade e elasticidade (BOTURA et al., 2013). Pertencente à classe das monocotiledôneas, em que o gênero *Agave* compreende cerca de 300 espécies nativas das zonas tropicais e subtropicais da América do Norte e América do

Sul. Deste gênero, somente duas espécies se destacam por sua importância comercial para a produção de fibra: *A. sisalana* e *A. fourcroydes* (SANCHES POTES et al., 1991).

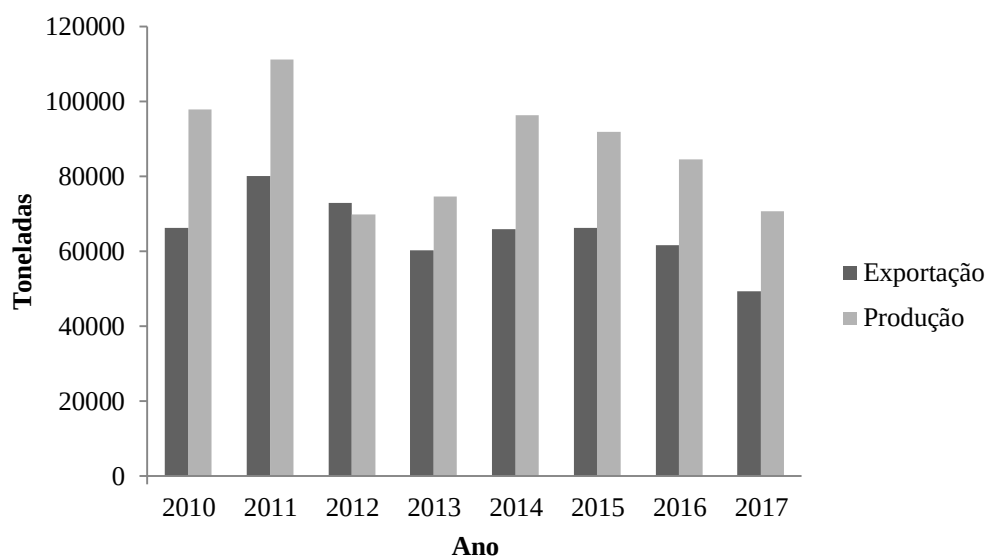
É um cultivar de grande interesse econômico em clima quente e regiões áridas, como o Nordeste do Brasil. As plantações estão concentradas nos Estados da Bahia e Paraíba. A sua fibra apresenta alto teor de celulose, cerca de 10% a mais do que o bagaço de cana. Composta praticamente por materiais lignocelulósicos, o sisal é de grande interesse econômico em regiões de clima quente e áridas, como o Nordeste do Brasil, com plantações concentradas principalmente nos estados da Bahia e da Paraíba. A fibra do sisal contém cerca de 90% de material gerador de açúcares fermentescíveis (DEBNATH et al., 2010).

Segundo Megiatto et al. (2007) as fibras de sisal apresentam elevado conteúdo de celulose (cerca de 70%), tornando-as uma alternativa potencial para a produção de etanol de segunda geração, substituindo o bagaço de cana e outras fontes, produzindo também outras substâncias com alto valor comercial. Em países tropicais como o Brasil, a disponibilidade de fibras naturais lignocelulósicas permite a possibilidade de exploração para a síntese de compostos biodegradáveis de várias aplicações (MISHRA et al., 2004).

A alta resistência, as diversas aplicações em vários seguimentos da economia, e as novas possibilidades para reutilização dos subprodutos gerados no processamento, fazem do sisal uma lavoura sustentável e com forte contribuição na economia. Sua fibra já está entre as naturais classificadas como fibra do futuro (FAO, 2016).

O Brasil é o maior produtor e exportador de sisal do mundo. Estima-se que 80% da produção brasileira de sisal destina-se ao mercado externo. A fibra beneficiada é exportada para 32 países, sendo a China, tradicionalmente o maior comprador, participando em 51% nas transações no ano de 2015 (BRASIL, 2015).

Em 2017 foram produzidas cerca de 70 mil ton de sisal no Brasil, e ao término do ano 2018, foram produzidas aproximadamente 67 mil ton. Mais da metade da produção desses dois anos foi destinada à exportação, principalmente na forma de fibras (CONAB, 2018). Entre os anos de 2010 e 2017, tanto a produção, quanto a exportação de sisal no Brasil oscilou bastante. Em 2011 foi registrada a maior produção (111.231 ton), e em 2012 a menor (69.865 ton) (Figura 1).

Figura 1. Produção e exportação do sisal ao longo dos últimos anos

Fonte: Adaptado de Naves (2018).

A produção de sisal no Brasil concentra-se praticamente em sua totalidade na Região Nordeste, particularmente em dois estados: Bahia e Paraíba (Tabela 1).

Tabela 1. Panorama da produção do sisal na Bahia, Paraíba, Nordeste e Brasil

Variável	Paraíba	Bahia	Nordeste	Brasil
Área destinada à colheita (ha)	5.280	85.926	91.303	91.306
Quantidade produzida	4.308	75.585	80.012	80.042
Rendimento médio (kg/ha)	816	880	876	877
Valor da produção (mil reais)	6.033	232.651	239.115	239.145

Fonte: IBGE (2019).

Com relação à exportação, a China domina o setor das fibras, enquanto os fios têm como principal destino os Estados Unidos da América. No Brasil, a maior parte do sisal produzido é exportado na forma de fibra e fios (Tabela 2).

Tabela 2. Exportação do sisal no Brasil (em 1000 ton) no 1º semestre de 2018

Produtos	Toneladas	US\$
Fibra	10.300	15.032
Fios	9090	20.468
Cabos, cordas, cordeis	908	2.094
Tapetes	115	854
Total	20.413	38.448

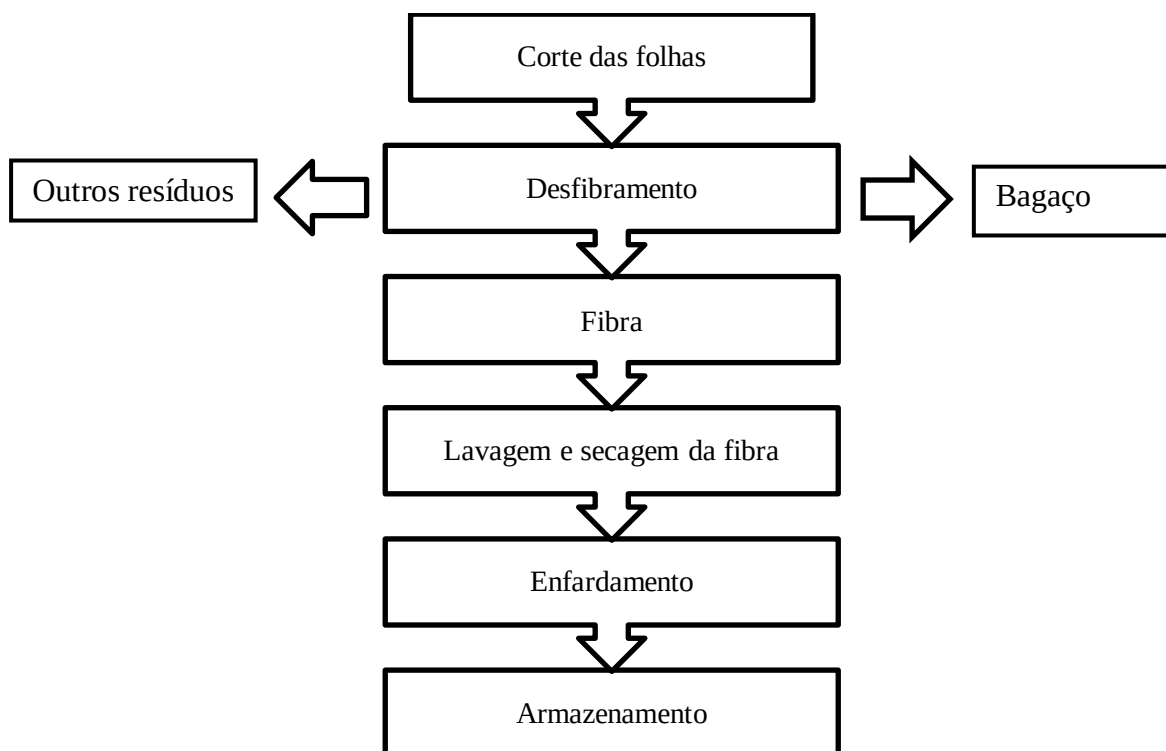
Fonte: CONAB (2018).

Uma alternativa para a utilização da fibra é o uso para a produção de biocompostos utilizando leveduras, uma vez que alguns microrganismos convertem, no interior de suas células, uma fonte de carbono em biocompostos de interesse da indústria (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

2.2.1 Fibra do sisal

Da planta do sisal, origina-se uma fibra dura e grossa, cuja coloração pode ser creme ou amarela pálida, variando de 1 a 1,5 m de extensão, que abastece 70% do mercado mundial de fibras duras. Cerca de 60% da produção de fibras são usadas na fabricação de barbante destinadas ao uso na agricultura, principalmente para a amarração de feno. Dos resíduos do desfibramento, pode-se produzir também o bagaço, que na maioria das vezes é utilizado na alimentação animal (SILVA et al., 2008). O processo de produção de fibras a partir do sisal é descrito na Figura 2.

Figura 2. Processo de produção de fibras do sisal



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2008).

O processo de obtenção da fibra inicia-se com o corte das folhas. No Brasil, as folhas são cortadas quando atingem 1,2 a 1,4 m de altura. O corte, enfeixamento, transporte e desfibramento são sincronizados para que as folhas sejam beneficiadas no mesmo dia, evitando o murchamento, que pode dificultar o processo de desfibramento e diminuir a qualidade da fibra (DIAS et al., 2015).

Após o corte, as folhas são transportadas para o desfibramento, etapa na qual são obtidas as fibras úmidas. Também são gerados nessa etapa os resíduos sólidos, inclusive o bagaço, os quais são descartados, ou aproveitados geralmente para a alimentação animal. A fibra úmida segue para a lavagem e posterior secagem, para em seguida ser enfardada e armazenada (BEZERRA, 2016).

Essa fibra proveniente das folhas do sisal é altamente resistente, sendo utilizada também para produzir artesanatos, aplicada na fabricação de vários produtos, podendo ser convertida em corda, barbante, tapetes, sacos, fios, bolsas, chapéus e vassouras. Faz parte também da pasta celulósica que origina o papel “*Kraft*”, de alta resistência, e outros tipos de papéis como papel de cigarro, higiênico, dielétrico, fraldas, entre outros (SILVA et al., 2008). Na Tabela 3 tem-se a composição química da fibra do sisal.

Tabela 3. Composição química da fibra do sisal

Componente	(%)
Celulose	73,10
Hemicelulose	13,30
Lignina	11,0
Pectina	0,90
Outros	1,70

Fonte: Adaptado de Mendes Neto (2008).

2.2.2 Resíduos gerados na produção da fibra do sisal

O cultivo do sisal pode contribuir para solucionar os problemas ocasionados pelas alterações climáticas, já que ao longo do ciclo de vida, a planta absorve mais dióxido de carbono do que produz. Além disso, o processamento da fibra gera resíduos orgânicos que podem ser utilizados para alimentação animal, produzir bioenergia, fertilizantes, entre outros (FAO, 2016).

Segundo Silva et al. (2008), durante o processamento das folhas do sisal para a produção de fibras, diversos resíduos são gerados. Apenas 3 a 5% do peso das folhas é convertido em fibras, o restante corresponde aos resíduos do processo de desfibramento, em média, 15% de mucilagem ou polpa, 1% de bucha (fibras curtas) e 81% de suco, ou seiva clorofilada.

Em média, são produzidos 95% de resíduos, sendo os principais o bagaço e os resíduos líquidos (SANTOS et al., 2015). O bagaço corresponde a aproximadamente 16% do material processado (mucilagem + bucha), sendo originado durante o desfibramento das folhas do sisal. É composto praticamente pelas partes verdes da folha, contendo também algumas fibras que são retiradas no processo de desfibramento (MENDONÇA, ANDRADE; BRANDÃO 2011).

2.3 LEVEDURAS OLEAGINOSAS

São classificados como microrganismos oleaginosos, aqueles capazes de acumular no interior de suas células, no mínimo, 20% de lipídios com relação a sua biomassa. São

conhecidas mais de 1600 espécies de leveduras, dentre essas, as consideradas oleaginosas não superam 40 (SITEPU et al., 2014).

Alguns microrganismos como bactérias, microalgas, fungos filamentosos e leveduras podem transformar uma fonte de carbono, quando em excesso, em lipídios no interior de suas células. Entretanto, leveduras unicelulares, que não apresentem endotoxinas, e que possam ser cultivadas em grande escala são mais interessantes para a biotecnologia (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011), pois, são fáceis de cultivar e poucas espécies são patogênicas. Elas são utilizadas para a produção sustentável de óleos biodegradáveis, os quais apresentam potencial para aplicação principalmente em alimentos e na síntese de combustíveis (SITEPU et al., 2014).

A produção de lipídios é uma característica comum a praticamente todos os microrganismos, porém em baixos percentuais (6 a 8%), fundamental na composição da membrana celular. Entretanto, microrganismos oleaginosos são capazes de converter uma fonte de carbono, quando em excesso, na presença da limitação de algum nutriente, geralmente o nitrogênio, em lipídios. Além das leveduras, incluem-se nesse grupo de microrganismos oleaginosos fungos filamentosos, bactérias e microalgas (RATLEDGE, 2002). Comparadas a bactérias e outros fungos, as leveduras levam vantagens por apresentar uma alta taxa de crescimento e a habilidade para o acúmulo de biocompostos no interior de suas células, quando cultivadas em resíduos e/ou meios de baixo custo, originários da agricultura ou da indústria (XUE et al., 2006; MALISORN; SUNTORNUSUK, 2007; ANGERBAUER et al., 2008).

Algumas linhagens são específicas, sintetizam quase que exclusivamente lipídios como *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Candida utilis*, *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica*, dentre outras. Porém, outros gêneros não se limitam apenas ao acúmulo de óleo em seu interior, produzindo também outros compostos, a exemplo dos gêneros *Yarrowia*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trischoporon*, *Candida*, *Lipomyces* e *Rhodotorula* (PAN et al., 2009; AGEITOS et al., 2011).

As leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Yarrowia* e *Rhodotorula*. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são aeróbios estritos, capazes de produzir glicogênio durante a fase exponencial de crescimento, e converter uma fonte de carbono em lipídios e carotenoides no interior de suas células durante a fase estacionária de crescimento (DWORECKA-KASZAK; KIZERWETTER- SWIDA, 2011).

Com relação ao acúmulo de lipídios, essa produção é bastante variável, enquanto a *Rhodotorula graminis* acumula em média 36%, a *R. glutinis* pode atingir até 72%, porém o

perfil de ácidos graxos de ambos os óleos produzidos é semelhante (BEOPOULOS et al., 2009).

Algumas linhagens dessas leveduras também acumulam outros biocompostos. Por serem lipossolúveis em sua grande maioria, os carotenoides normalmente encontram-se dissolvidos nos lipídios, e a biossíntese desses pigmentos, como o β -caroteno, o toruleno e a torularrodina, carotenoides naturais com elevada importância comercial, configuram as leveduras como fontes potenciais destes pigmentos (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

2.3.1 *RHODOTORULA mucilaginosa*

Leveduras da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* são encontradas facilmente na natureza, sendo amplamente distribuídas nos mais diversificados ambientes, podem estar presentes em ecossistemas terrestres, na água doce, na água do mar, dentre outros, pois são capazes de se multiplicarem em uma vasta quantidade de substratos (LIBKIND et al., 2008).

De acordo com Machado et al. (2019), a levedura *R. mucilaginosa* pode ser considerada uma fonte sustentável de biocompostos, podendo ser obtidos simultaneamente diversos componentes de interesse da indústria, uma vez que essa levedura é capaz de acumular lipídios em elevadas concentrações no interior de suas células, sintetizar carotenoides, principalmente β -caroteno, substâncias antimicrobianas e enzimas (Li et al., 2010; MOLINÉ, LIBKIND; BROOCK, 2012).

Quando cultivada em um meio composto por 30,0 g/L de glicerol, 5,0 g/L de KH_2PO_4 , 1,0 g/L de Na_2HPO_4 , 3,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,2 g/L de extrato de levedura, com um pH inicial de 4,5 e temperatura de 25 °C, a levedura *R. mucilaginosa* produziu sua máxima biomassa (9,20 g/L), e um teor de lipídios equivalente a 59,96% (SPIER, 2014).

Sua facilidade para crescer em diversos substratos possibilita o cultivo em resíduos brutos, minimizando os custos dos biocompostos produzidos. Ao ser cultivada em manipueira, a levedura *R. mucilaginosa* produziu uma biomassa máxima de 6,95 g/L e um percentual de lipídios de 13,33%, com um coeficiente de conversão da fonte de carbono em lipídios superior ao meio sintético (SILVA et al., 2018). Essa levedura é conhecida pela também pela capacidade de sintetizar carotenoides, tendo o β -caroteno como carotenoide principal (Li et al., 2010; MOLINÉ, LIBKIND; BROOCK, 2012).

Spier (2014) avaliou a influência das condições de cultivo na produção de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizando-se o glicerol bruto como substrato. Os

maiores efeitos positivos foram encontrados para extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sendo as concentrações fixadas em 1,2 e 3 g/L, respectivamente. Com relação à temperatura, a qual apresentou efeito negativo significativo sobre a biomassa, foi fixada em 25 °C. Os demais parâmetros não apresentaram efeitos significativos, por isso foram fixados em: pH 4,5; 30 g/L de glicerol; 5,0 g/L de KH_2PO_4 ; 1,0 g/L de Na_2HPO_4).

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi capaz de crescer e acumular lipídios quando cultivada em manipueira, produzindo 6,95 g/L de biomassa e 13,33% de lipídios. Foram testadas três concentrações de substrato (50, 75 e 100%), sendo que a concentração de manipueira equivalente a 100% apresentou o melhor coeficiente de conversão de açúcares redutores em biomassa, inclusive superior ao ensaio utilizando-se um meio sintético (SILVA et al., 2018).

O pH, a temperatura e a taxa de agitação ideais para o cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* foram determinados utilizando-se a metodologia de superfície de resposta. Também foi investigado o potencial de alguns resíduos (casca de feijão, batata, ervilha e cebola) servirem como fonte de nutrientes para o crescimento dessa levedura. O pH de 6,1, a temperatura de 25,8 °C e a taxa de agitação de 119,6 rpm foram fixados, pois nessas condições foram obtidos os melhores resultados para a produção de carotenoides (SHARMA; GHOSHAL, 2020).

O melaço da cana-de-açúcar mostrou-se um bom substrato para o cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, uma vez que a biomassa e os carotenoides produzidos foram mais elevados do que quando se utilizou um meio sintético. A produção total de carotenoides foi de 2611 µg/L sendo 23,8% de β-caroteno, 67,5% de toruleno e 8,7% de torularrodina. O pH e a temperatura ótimos para a síntese de carotenoides foram 5 e 25 °C, respectivamente (CHENG; YANG, 2016).

2.4 LIPÍDIOS

Os lipídios são compostos que na grande maioria são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Compõem um grupo de substâncias com estrutura bastante diversificada, dividindo-se em duas classes básicas: moléculas derivadas de unidades fromisopreno, tais como os esteroides, carotenoides, ácidos graxos e seus similares como alcanos e alcenos (SITEPU et al., 2014).

São compostos de extrema importância para o organismo, pois são capazes de fornecer energia em grande quantidade (9 kcal/g), ser fonte de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis, propiciar isolamento térmico, além de contribuir para o sabor e a palatabilidade dos alimentos. São amplamente encontrados na natureza, podendo estar presentes em células animais, vegetais e microbianas (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Em sua grande maioria, os lipídios são formados por ácidos graxos e glicerol (lipídios simples). Quando além desses, há grupos fosfóricos, nitrogenados, carboidratos, entre outros, denominam-se lipídios compostos. Os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, sendo que os insaturados podem ser definidos como ácidos monocarboxílicos contendo uma ou mais ligações duplas entre dois carbonos da molécula. O total de duplas ligações irá definir se o lipídio será classificado como mono ou poliinsaturados. A posição da primeira dupla ligação da cadeia carbônica, a partir do grupo metila, é responsável pela denominação do ácido graxo, por meio da letra ω , sendo os mais conhecidos ω -3, ω -6 e ω -9 (SANTOS et al., 2013).

A indústria vem utilizando uma vasta variedade de óleos vegetais como o óleo de soja, óleo de algodão, óleo de milho, óleo de canola e óleo de girassol para a produção de alimentos para a síntese de biocombustíveis, principalmente o biodiesel. Entretanto, há uma demanda pela busca por fontes alternativas e sustentáveis de óleos com perfis de ácidos graxos semelhantes ou de qualidade superior aos de origem vegetal. Dessa forma, várias pesquisas vêm sendo conduzidas com esse propósito e vários microrganismos vêm sendo testados, principalmente microalgas e leveduras (SUN et al., 2015; XUE et al., 2010).

As descobertas feitas nos primeiros anos de estudos referentes à produção de lipídios por microrganismos incentivaram novas pesquisas, principalmente relacionadas à busca por espécies com alta produtividade, condições ótimas de cultivo e por substratos que fornecessem os nutrientes necessários com baixo custo (SITEPU et al., 2014).

Os óleos provenientes de microrganismos apresentam várias possibilidades de aproveitamento pela indústria, com potencial para ser utilizados na síntese do biodiesel, como aditivos alimentares, ou como substitutos de óleos e gorduras vegetais, como manteiga de cacau e óleo de palma. Além disso, apresentam algumas vantagens com relação aos óleos oriundos de fontes vegetais, tais como menor período de produção, necessidade de mão de obra reduzida, não interferência de alterações sazonais, principalmente relacionadas ao clima, e fácil possibilidade de ampliação da escala de produção (WANG; YANG; WANG, 2014).

De acordo com Fahy et al. (2005), o perfil de ácidos graxos de um óleo é responsável pela qualidade do mesmo. A relação entre os monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) é um dos principais parâmetros utilizados para a determinação dessa qualidade. Lipídios microbianos levam vantagem nesse aspecto, pois há predominância de insaturados, principalmente o oleico e o linoleico, ambos ácidos graxos essenciais. A análise qualitativa dos lipídeos obtidos a partir de microrganismos também é importante para determinar a sua aplicação com base em seu perfil de ácidos graxos (BEOPOULOS et al., 2009).

2.4.1 Produção biotecnológica de lipídios

Diversos microrganismos são capazes de converter uma fonte de carbono, quando em excesso, em lipídios no interior de suas células. Ao se esgotar um nutriente do meio, geralmente o nitrogênio, a fonte de carbono em excesso principalmente sob a forma de glicose, é convertida em triacilgliceróis. (RATLEDGE, 2002).

Durante o crescimento do microrganismo, o carbono presente é distribuído entre os principais constituintes celulares (carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas). O nitrogênio é imprescindível para a produção de ácidos nucleicos e proteínas essenciais para a multiplicação celular, assim, uma limitação de nitrogênio retarda o processo. Quando esse nutriente se aproxima da escassez, a taxa de crescimento diminui bruscamente, à medida que a taxa de assimilação de carbono se reduz mais lentamente, resultando em um direcionamento do fluxo de carbono quase que exclusivamente para a síntese de lipídios, ocasionando em um armazenamento de triacilgliceróis nas células (BEOPOULOS et al., 2009).

O balanço de nutrientes adequado do meio é fundamental, tanto para o crescimento da levedura, quanto para a síntese de lipídios, sendo fundamental a presença de dois nutrientes: carbono e nitrogênio. Durante o desenvolvimento do microrganismo, o primeiro é usado para os processos anabólicos e energéticos, enquanto que o segundo é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Ao cessar o nitrogênio, o crescimento diminui e a síntese de lipídios no interior das células aumenta significativamente (AMARETTI et al., 2010).

A capacidade de acumular lipídios em leveduras varia bastante, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*, embora cultivadas em condições favoráveis, geralmente não conseguem acumular óleos a níveis superiores a 10% da biomassa seca, já

algumas do gênero *Rhodotorula spp.* e *Cryptococcus curvatus* são capazes de acumular até 70% de lipídios (MENG et al., 2009). Vários substratos foram usados para a produção de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, alguns deles são mostrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Produção de lipídios utilizando a levedura *R. mucilaginosa*

Substrato	Referência
Glicerol bruto	Spier (2014)
Inulina hidrolisada e tubérculos de alcachofra	Zhao et al. (2010)
Amido de mandioca	Li et al. (2010)
Melaço de cana-de-açúcar	Karatay; Donmez (2010)
Manipueira	Silva et al. (2018)

O parâmetro teor de lipídios em biomassa seca (%) é o mais comumente usado para expressar a capacidade de um microrganismo oleaginoso acumular lipídios, entretanto, existem outros que podem também ser usados, como a concentração de lipídios (g de lipídios/L); coeficiente lipídico (rendimento lipídico por consumo de glicose, em g de lipídios/g de glicose); concentração de biomassa (g de células/L); e produtividade de lipídios (taxa específica de produção de lipídios, em g de lipídios/L/h) (ORDOG et al., 2013; SONG et al., 2013).

2.5 CAROTENOIDES

Os carotenoides compreendem um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais em virtude da ampla distribuição, diversidade e várias funções, sendo responsáveis principalmente por proporcionar a cor de muitos alimentos, variando desde o amarelo até o vermelho intenso. Também podem estar presentes em algas, bactérias e leveduras, em alguns casos, sintetizados pelos mesmos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Além de atuarem como corantes em vários setores da indústria, os carotenoides também contribuem para o bom funcionamento do mecanismo de defesa do organismo humano, protegendo o corpo contra diversas doenças (PECHINSKII; KUREGYAN, 2014). Apresentam também atividade pró-vitamina A, ação antioxidante e anticancerígena, devido ao sistema de duplas ligações conjugadas, também responsável pela cor característica e

instabilidade. É de grande interesse para a indústria de alimentos, já que vem aumentando a demanda por alimentos cada vez mais naturais (MORAIS, 2006).

Alimentos como cenoura, nabo, couve, manga, melão, abóbora, pimentão, espinafre e batata-doce são boas fontes de beta caroteno. Por sua vez, o licopeno é encontrado principalmente na melancia, goiaba e tomate, a luteína e a zeaxantina em folhas verdes, como espinafre e couve, e em outros vegetais como o milho, caqui e brócolis (CARRILHO et al., 2014).

Devido à variedade de cores que proporcionam, os carotenoides são amplamente utilizados como corantes em alimentos, aditivos cosméticos. Diferentemente dos sintéticos, os carotenoides naturais apresentam também propriedades antioxidantes, dessa forma, a demanda por esses pigmentos aumentou significativamente nos últimos anos (CHENG e YANG, 2016).

São pigmentos obtidos quase que exclusivamente por processos químicos, entretanto, a produção biotecnológica vem ganhando espaço, pois se destaca pela possibilidade da utilização de substratos pouco onerosos, independência das condições ambientais e necessidade de um menor espaço para a produção (ZENI et al., 2011). Uma pequena parte é extraída de plantas e algas, e devido ao aumento da demanda por substâncias naturais, alternativas de produção desses biocompostos estão sendo estudadas (MEZZOMO; FERREIRA, 2016).

Os carotenoides apresentam uma significativa importância industrial, e podem ser produzidos por diversos organismos como bactérias, fungos e plantas. Vários resíduos, como o soro de leite e o extrato de batata, foram estudados para a síntese de carotenoides por meio de leveduras (MAROVA et al., 2012) e a otimização das condições de cultivo tem sido uma das estratégias utilizadas para aumentar-se a produção de carotenoides e, dessa forma, elevar a viabilidade do processo (SANTOS et al., 2016).

Há uma grande demanda por esses pigmentos devido ao uso como corantes em alimentos, em suplementos alimentares, ou como aditivos para produtos farmacêuticos e cosméticos, sendo a maior parte suprida pela síntese química, entretanto, a via biotecnológica, apresenta a vantagem de produção de pigmentos naturais, tendo assim maiores benefícios à saúde do consumidor (YOLMEH; KHOMEIRI, 2017), sendo que a extração desses pigmentos, a partir de tecidos de plantas e biomassa microbiana, é feita geralmente utilizando-se óleos vegetais e solventes orgânicos (MEZZOMO; FERREIRA, 2016).

Um dos mais importantes carotenoides é a astaxantina, pigmento pertencente à família das xantofilas, os oxigenados derivados dos carotenoides. O interesse pela astaxantina tem aumentado devido ao uso como corante natural para a alimentação das aves, na aquicultura e ao uso como suplemento alimentar na criação de salmão, truta e camarão. E a sua poderosa capacidade antioxidante, tem sido utilizada também na medicina (BOUSSIBA, 2000).

Sua estrutura química com 11 ligações duplas conjugadas faz com que seu poder antioxidante seja 10 vezes maior que o do β -caroteno e até 500 vezes mais forte do que o da vitamina E. Por outro lado, é um carotenoide altamente instável, podendo ser degradado facilmente pela luz e pelo calor (CHEN et al., 2007). A astaxantina apresenta potencial para a prevenção e tratamento de várias doenças como alguns tipos de cânceres (cólon, mama, próstata, bexiga), doenças cardiovasculares, gastrointestinais, oculares, neurodegenerativas, hipertensão, entre outras. Estudos vêm sendo realizados para a produção deste carotenoide utilizando-se métodos alternativos, podendo ser extraído de microalgas (KIM et al., 2016) e leveduras (FONSECA et al., 2011).

2.5.1 Produção biotecnológica de carotenoides

As plantas ainda são as importantes fontes de carotenoides naturais, entretanto, vários processos biotecnológicos têm sido estudados e explorados comercialmente para a exploração de tais compostos (CAMPENNI' et al., 2013).

Nas leveduras, os carotenoides têm como principal função a proteção contra a ação da luz visível (UV), combinada com o oxigênio singlete, fazendo com que os radicais livres produzidos durante o metabolismo celular sejam desativados. A energia é transferida para o cerotenoide, que por sua vez pode retornar ao estado fundamental através da liberação de calor (BERERA et al., 2010).

O grande interesse pelos carotenoides naturais tem sido responsável pela busca da produção através da biotecnologia, em que um dos objetivos principais é aumentar a produção de carotenoides por microrganismos, principalmente pela otimização de processos. A escolha da melhor condição de cultivo é de extrema importância, pois não afeta apenas o crescimento do microrganismo, influenciando também na produção e na especificidade dos carotenoides (MEZZOMO; FERREIRA, 2016).

Cheng e Yang (2016) utilizaram a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* para produzir carotenoides, usando como substratos diversos resíduos alimentícios. O pH e a temperatura

ideais para a síntese de carotenoides foram 5 e 25 °C respectivamente, sendo a produção melhorada com a adição de íons metálicos. Dentre os resíduos usados como substrato, o crescimento celular e a síntese de carotenoides no melaço foram melhores do que no meio controle (YM).

De acordo com Kot et al. (2017), o pH entre 4 e 7 não exerceu nenhum efeito sobre a biomassa e os carotenoides produzidos pela levedura *R. glutinis* quando cultivada em um meio contendo glicerol e batata desproteinizada. Foram produzidos toruleno e B-caroteno como carotenoides majoritários, e o perfil lipídico composto principalmente por ácido oleico linoleico e palmítico.

Machado et al. (2019) otimizaram a produção de carotenoides pela levedura *R. mucilaginosa* utilizando um meio sintético, em que a produção máxima dos biocompostos foi obtida utilizando-se 30 g/L de glicose 10 g/L de extrato de malte, 2 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona, pH inicial de 6,0, 25 °C e 130 rpm, por 144 h, sendo que as fontes de nitrogênio foram os fatores que mais influenciaram o acúmulo intracelular de carotenoides.

Manimala e Murugesan (2017) utilizaram alguns resíduos como substratos para a síntese de carotenoides pela levedura *R. mucilaginosa*. A maior produção de pigmentos foi alcançada com o bagaço de mandioca, seguida da farinha de arroz e bagaço de cana. A condição ideal de fermentação para atingir o rendimento máximo de carotenoides totais foram obtidas usando-se o bagaço de mandioca com um pH inicial a 6,0 e a temperatura de cultivo de 25 °C por 4 dias.

Para reduzir os custos de produção, Otero et al. (2018) usaram água de arroz, glicerol bruto e melaço de cana nas formulações dos meios de cultivos para a síntese de carotenoides por leveduras isoladas de florestas localizadas no Sul do Brasil. *Sporidiobolus pararoseus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia fermentans* foram selecionados como potenciais produtores de carotenoides, sendo que a melhor produção de *R. mucilaginosa* foi obtida quando a levedura foi cultivada em um meio à base de água de arroz fervida e melaço de cana. Os resíduos agroindustriais usados, que substituíram as fontes de nitrogênio e carbono comumente usadas nos meios de cultura, permitiram às leveduras isoladas produzir carotenoides.

As leveduras vermelhas do gênero *Rhodotorula* foram cultivadas por Besarab et. al. (2018) em um meio à base de mosto de cerveja, com concentração de açúcar de 6 graus Balling, temperatura de 26 °C, taxa de agitação de 200 rpm, durante 4 dias. Duas linhagens

de *R. glutinis*, BIM Y-253 e BIM Y-158 sintetizaram mais de 100 µg de carotenóides por cada grama de biomassa, com predominância de toruleno e torularrodina.

A levedura *R. glutinis*, quando cultivada por Tkáčová et al. (2017) em um meio com baixas relações Carbono / Nitrogênio (20:1 e 50:1), utilizou totalmente a glicose presente no meio, e a formação de carotenoides foi estimulada. A produção máxima de pigmentos atingiu 12,9 mg/L de meio e 2,3 mg.g⁻¹ de biomassa na razão C/N de 20:1. A síntese de β-caroteno predominou enquanto a glicose era presente no meio, porém à medida que a glicose foi se exaurindo, prevaleceu a síntese de torularrodina.

Leyton et al. (2019) verificaram que as condições de cultura que maximizaram a total concentração de carotenoides (1,84 mg/L) foram pH inicial igual a 7, extrato de levedura na concentração de 4 g/L, concentração de extrato de algas marinhas em 25% v.v⁻¹, incubação realizada a 25 °C e 150 rev.min⁻¹, durante 6 dias. Foram identificados entre os pigmentos produzidos por *R. mucilaginosa* o licopeno como carotenoide majoritário, seguido pelo B-caroteno, e pela astaxantina.

Schneider et al. (2013) verificaram que os carotenoides foram sintetizados em todos os tratamentos, especificamente o B-caroteno (50%), usando um meio composto por resíduos de cervejaria para o cultivo da levedura *R. glutinis*. O efluente usado pode ser considerado um bom meio para fermentação microbiana visando à produção de carotenoides, uma vez que se é fonte de carbono, nitrogênio e outros nutrientes.

O maior teor de carotenoides extraídos da levedura *R. glutinis* R12 por Gerelmaa et al. (2018) foi de 283,71 µg/g de biomassa seca. As análises da atividade antioxidante máxima dos pigmentos pelos ensaios de DPPH revelaram que a cepa de *R. glutinis* R12 tem a capacidade de produzir carotenoides com atividade antioxidante.

Cipolatti et al. (2019) produziram carotenoides a partir das leveduras *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus pararoseus* e *Pichia fermentans*, com meios à base de glicerol bruto e licor de maceração de milho (M1) e melaço de cana de açúcar e licor de maceração de milho (M2). O B-caroteno foi o principal carotenoide produzido (acima de 63% em todos os meios), sendo que *S. pararoseus* apresentou a melhor produção de carotenoides, enquanto que os pigmentos produzidos por *P. fermentans* quando cultivada no meio composto por melaço de cana de açúcar e licor de maceração de milho apresentaram melhor potencial antioxidante.

Moreira et al. (2018) produziram carotenoides usando extratos da casca e da polpa do café como substratos. Os carotenoides produzidos apresentaram atividades antioxidantes e antimicrobianas contra bactérias patogênicas, como *Salmonella incol*, *Staphylococcus*

aureus e *Listeria monocytogenes*, bem como fungos tóxicos, como *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Essas características dos pigmentos são importantes para substituir os artificiais comumente usados em indústrias alimentícias e farmacêuticas, permitindo que os consumidores escolham mais produtos naturais e menos onerosos.

Banzatto et al. (2013) verificaram que a maior produção de biomassa seca de levedura *Rhodotorula Rubra* foi obtida com o meio de melaço suplementado com ureia ou Nitrofos KL (15,09 e 14,87 g/L, respectivamente). O melhor meio de crescimento para a produção volumétrica de carotenoides foi o melaço (2,74 mg/L), enquanto aqueles suplementados com uréia e Nitrofos KL produziram 2,55 e 2,32 mg/L, respectivamente. Os principais pigmentos produzidos foram toruleno, torularodina e β -caroteno.

Cutzu et al. (2013) constataram que a produção otimizada de carotenoides totais pela levedura *R. glutinis*, submetida à mutação sob efeito da luz ultravioleta (UV), foi cerca de 100% superior à não otimizada. A cepa da levedura mutante representa um potencial biocatalisador para a conversão de glicerol bruto em metabólitos de valor agregado e uma ferramenta para a valorização desse subproduto da indústria de biodiesel.

Silva et al. (2012) analisaram os efeitos da temperatura de cultivo e da concentração de glicerol puro sobre a biomassa e os carotenoides produzidos pela levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268. A elevação da temperatura de 20 para 25 °C provocou um aumento significativo na biomassa para todas as concentrações de glicerol puro, atingindo os níveis máximos de 8,9 g/L, produção específica de carotenoides de 91,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, e produção volumétrica de carotenoides de 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com 40 g/L de glicerol puro.

Sharma e Ghoshal (2020) avaliaram o pH, a temperatura e a taxa de agitação ideais para o crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, através da metodologia de superfície de resposta. Os autores usaram como substratos casca de feijão, de batata, de ervilha e de cebola e concluíram que o pH de 6,1, a temperatura de 25,8 °C e a taxa de agitação de 119,6 rpm foram as condições ideais para a produção de carotenoides.

Machado; Soares; Bianchi (2019) estudaram a produção de pigmentos carotenoides usando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e o bagaço de laranja como substrato. Os cultivos foram realizados variando-se a granulometria do bagaço e o pH inicial, assim como a variação da composição dos meios, através da suplementação com peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, fosfato de potássio e sulfato de magnésio. A produção máxima foi equivalente a 228,38 mg de carotenoides por kg de bagaço.

Pereira et al. (2019) propuseram uma estratégia inovadora para o cultivo de *R. mucilaginosa* visando à produção de lipídios e carotenoides de elevado valor agregado, com

potencial para competir com os óleos vegetais existentes no mercado. O glicerol bruto foi utilizado como substrato e conseguiu-se produzir 21 g/L de biomassa, 51% de lipídios e um teor de carotenoides de 2843 ug/L.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima usada foi o sisal (*Agave sisalana*). O bagaço e a fibra utilizados foram obtidos no município de Cuité, PB, Latitude: 06° 29' 01" S e Longitude: 36° 09' 13" W.

4.1.1 Tratamento da matéria-prima

Com a finalidade de reduzir a umidade presente, o bagaço foi submetido a um processo de secagem em estufa com circulação e renovação de ar Tecnal, TE-394/92, a 70 °C, por 2 h. A fibra foi cortada em pequenos pedaços a fim de facilitar o processo posterior de hidrólise. Nas Figuras 3 e 4 têm-se a fibra e o bagaço de sisal após o processo de secagem.

Figura 3. Fibra do sisal após secagem



Fonte: Autor (2019)

Figura 4. Bagaço do sisal após secagem



Fonte: Autor (2019)

4.2 CARACTERIZAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA DA FIBRA E DO BAGAÇO DO SISAL

A caracterização termogravimétrica foi realizada no Laboratório de Carvão Ativo (Centro de Tecnologia/UFPB), utilizando-se uma rampa de aquecimento de 10 °C/min, partindo-se da temperatura ambiente (25 °C) até 1000 °C. A análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 25 mL/min e massa inicial da amostra de 10,48 mg. Na Figura 5 tem-se o equipamento utilizado para a caracterização termogravimétrica, uma termobalança (TGA Q50).

Figura 5. Balança termogravimétrica utilizada na análise



Fonte: Autor (2019)

4.3 HIDRÓLISE DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Com o objetivo de determinar-se a melhor condição de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos em questão, um planejamento fatorial 2^2 com 4 pontos centrais foi realizado. Os níveis e as variáveis envolvidas estão dispostos na Tabela 4.

Tais condições foram determinadas com base no estudo realizado por Lima et al. (2013), que realizaram a hidrólise ácida da fibra do sisal. O processo foi efetivado em autoclave vertical – linha AV, modelo AV-50 (Figura 6), e a proporção biomassa/solução ácida foi de 1:10 m/v, com uma temperatura equivalente a 120 °C.

Tabela 4. Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^2

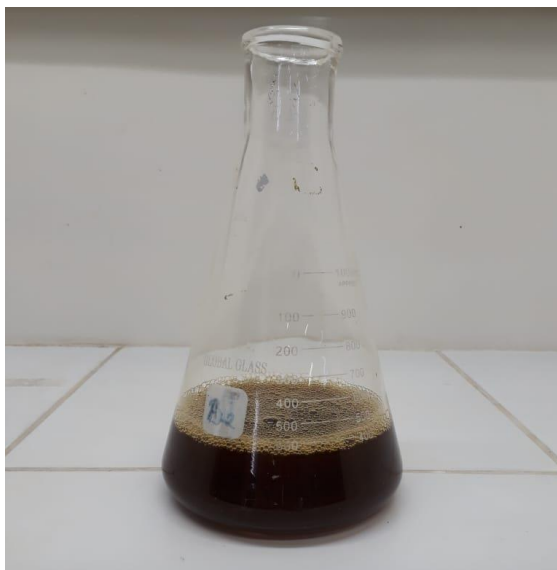
Variável/nível	-1	0	+1
[H ₂ SO ₄] (%)	1,5	3,5	5,5
Tempo (h)	1	2	3

Figura 6. Autoclave utilizada para a realização das hidrólises do bagaço e da fibra do sisal



Fonte: Autor (2019)

Figura 7. Hidrolisado do bagaço do sisal



Fonte: Autor (2019).

4.4 QUANTIFICAÇÕES DOS AÇÚCARES E INIBIDORES PRESENTES NOS HIDROLISADOS DA FIBRA E DO BAGAÇO DO SISAL

4.4.1 Açúcares redutores e redutores totais (AR e ART)

Para a determinação dos açúcares redutores utilizou-se uma modificação do método do DNS, originalmente proposto por Miller (1959).

Curva padrão: Na construção da curva padrão foram pesados 100 mg (0,1 g) de glicose e dissolvidos em 100 mL de água destilada em balão volumétrico. Após agitação vigorosa, transferiu-se 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 mL da solução-mãe para tubos de ensaio, o volume foi completado para 10 mL com água destilada. Os tubos foram homogeneizados e de cada tubo transferiu-se 1 mL para tubos com 1 mL de DNS (em duplicata). Os tubos foram aquecidos a 100 °C por 5 min, tendo-se o cuidado de não colocar os tubos antes de aquecimento vigoroso do banho e então resfriados em banho com água à temperatura ambiente por 3 min.

A cada tubo foram adicionados 8 mL de água destilada, e após homogeneizado, a absorvância foi lida a 540 nm. Com os valores de absorvância, foi construída a curva de absorvância versus concentração.

Análise das amostras: Inicialmente foi determinada a quantidade inicial de amostra que resultasse em leitura dentro da faixa da curva padrão. As diluições necessárias foram

usadas no cálculo para determinação do teor de açúcar da amostra desconhecida. Depois de dissolver determinada quantidade de amostra em um volume definido de água, transferiu-se 1 mL para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. A seguir, os tubos foram levados para banho de água fervente por exatos 5 min. Após este intervalo, os tubos foram retirados do banho de água quente e colocados em banho de água fria por 3 min, até completo resfriamento. Em cada tubo foi adicionado 8 mL de água destilada e feita à leitura imediatamente a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorvância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução.

Efetuaram-se os cálculos para expressar os resultados em g/L da amostra inicial. Quando a amostra tem sacarose é necessário fazer a inversão da sacarose, para análise dos açúcares totais. Para tal, foram misturados 1 mL da amostra com 1 mL de solução de ácido clorídrico 2 mol/L (16,8 mL de ácido concentrado por 100 mL), em seguida os tubos foram colocados em banho com água fervente por 5 min e resfriados em banho de água gelada. Depois de esfriar foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 2 mol/L. Homogeneizou-se bem e seguiu-se o procedimento idêntico à determinação de açúcares redutores a partir do item 5 da curva padrão. Neste caso multiplicou-se o resultado por 4 (diluição) para obter o valor de açúcares redutores totais (g/L) (MILLER, 1959).

4.4.2 Perfil de açúcares: análise qualitativa

Para a quantificação dos açúcares fermentescíveis (glicose, xilose, arabinose), bem como dos possíveis inibidores (furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético), contidos no hidrolisado hemicelulósico produzido pelo tratamento ácido, foi realizada uma análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Um cromatógrafo (VARIAN, Waters, Califórnia, USA) equipado com um sistema isocrático de solvente, válvula Rheodyne com alça de 20 μ L e acoplado a uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 m x 30 mm, 8 μ m) foi utilizado (Figura 8).

Utilizou-se a temperatura de 60 °C e a fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 0,009 mol/L a uma taxa de escoamento de 0,6 mL/min. O tempo de duração da corrida foi de 1 h. Com base no perfil de açúcares e inibidores obtidos, foram determinadas as condições de concentração de ácido e tempo de hidrólise para o prosseguimento da pesquisa, tanto para a fibra, quanto para o bagaço do sisal.

Figura 8. Cromatógrafo de alta eficiência utilizado na quantificação de açúcares e inibidores dos hidrolisados da fibra e do bagaço do sisal



Fonte: Autor (2019)

4.5 PRODUÇÃO DOS HIDROLISADOS DA FIBRA E DO BAGAÇO DO SISAL

Estabelecidas as condições de hidrólise, os hidrolisados da fibra e do bagaço do sisal foram produzidos em maiores quantidades para realização dos cultivos utilizando-se a levedura produtora de biomassa e carotenoides.

4.6 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 3892, fornecida pela Fundação André Tosello, Coleção de Culturas Tropicais de São Paulo, na forma reativada. Para o crescimento e manutenção da linhagem, realizaram-se repiques periódicos. Nesse processo, o microrganismo utilizado espalhado em placas de Petri contendo o meio YMA (Yeast Malt Agar) cuja composição encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Composição do meio YMA (*Yeast Malt Agar*)

Componente	Concentração (g/L)
Dextrose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Bacto peptona	5,0
Ágar	20,0

Fonte: Silva et al. (2018)

As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias, após esse período, mantidas sob refrigeração (4 °C), sendo feitos repiques periódicos entre 30 e 40 dias, visando-se manter a vitalidade do microrganismo.

Figura 9. Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* reativada

Fonte: Autor (2019)

Figura 10. *R. mucilaginosa* em placa de Petri



Fonte: Autor (2019)

4.7 CULTIVO PILOTO UTILIZANDO-SE OS HIDROLISADOS DA FIBRA DO SISAL

O hidrolisado da fibra sisal teve o pH ajustado até 5,5 utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio 40%, em seguida, foi esterilizado a 120 °C por 15 min. Adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada a uma placa de Petri contendo a levedura *R. mucilaginosa*, raspando-se as células até formar uma suspensão. Os 5 mL foram transferidos para um frasco *Erlenmeyer* de 150 mL contendo 50 mL do hidrolisado da fibra do sisal, todo o processo em uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada. Após o inóculo, o frasco *Erlenmeyer* foi levado para a incubadora tipo *Shaker* a 30 °C e 200 rpm. Após 24 h, coletou-se 1 mL do meio (pré-inóculo) e realizou-se uma contagem celular em câmara de Neubauer para cálculo do volume de inóculo correspondente a 10^7 células/mL. Esse volume de inóculo foi adicionado em 200 mL do hidrolisado da fibra do sisal com pH previamente ajustado até 5,5 e autoclavado a 120 °C por 15 min. O ensaio foi realizado em triplicata. Após o inóculo, os *Erlenmeyers* foram levados à incubadora tipo “Shaker” a 30 °C e 200 rpm (SILVA et al., 2018).

4.7.1 Biomassa

Em intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 h, alíquotas de 2 mL da amostra foram coletadas, diluídas em água destilada e lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP 220) ao comprimento de onda de 540 nm. O branco da análise foi o meio sem inóculo, lido no início do cultivo. Converteu-se o valor da absorbância em concentração através de uma curva padrão de biomassa (AKSU; EREN, 2007).

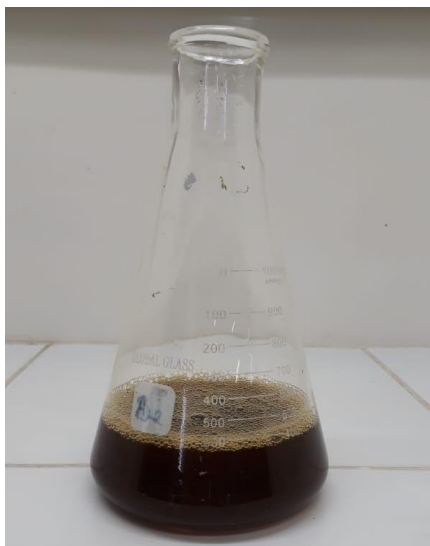
4.8 DETOXIFICAÇÃO DO LICOR HEMICELULÓSICO

Para a remoção dos inibidores gerados durante o tratamento ácido da biomassa e conseguinte clarificação do licor, o hidrolisado foi submetido a um ajuste de pH pela adição de hidróxido de cálcio (CaOH) até a obtenção de um valor próximo ao da neutralidade, $\text{pH} = 7,0$, e em seguida o mesmo foi diminuído até um valor de $\text{pH} = 5,5$ pela adição de ácido fosfórico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$).

Após esse processo de ajuste de pH, o licor foi mantido em câmara fria por 24 h, adiante realizou-se uma filtração por um sistema a vácuo utilizando-se papel de filtro como meio filtrante para proporcionar a separação do precipitado formado. O filtrado teve seu pH ajustado para 1,8 utilizando-se ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro e a adsorção foi então realizada sob agitação de 200 rpm, a 30 °C por 60 min utilizando como adsorvente o carvão ativo comercial (VILLAREAL, 2004).

Para a definição da quantidade de carvão ativo utilizada, foram testadas 3 concentrações: 1, 3 e 5% m/v de carvão com relação ao volume de hidrolisado, sendo adotado como critério a quantidade de inibidores e o teor de açúcares removidos.

Figura 11. Hidrolisado do bagaço do sisal



Fonte: Autor (2019)

Figura 12. Hidrolisado do bagaço do sisal após adsorção



Fonte: Autor (2019)

4.9 PRODUÇÃO DE BIOMASSA, LIPÍDIOS E CAROTENOIDES UTILIZANDO-SE O HIDROLISADO DO SISAL DETOXIFICADO E A LEVEDURA *R. mucilaginosa*

4.9.1 Biomassa

Foi determinada de acordo com o descrito no item 4.7.1.

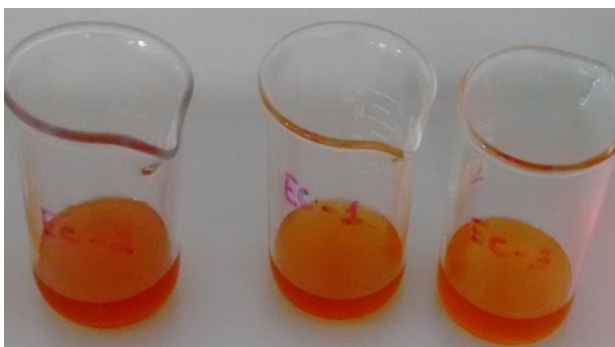
4.9.2 Consumo do substrato

Durante os intervalos de tempo estabelecidos, foram coletadas alíquotas de 1 mL do fermentado para a quantificação dos açúcares presentes utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.9.3 Lipídios totais

Ao término do cultivo (120 h), foram determinados os lipídios totais de acordo com o método de Bligh; Dyer (1959), adaptado por Manirakiza; Covaci; Schepens (2001). As adaptações foram feitas com base na redução do volume dos solventes com relação à redução da biomassa utilizada. Primeiramente a biomassa seca a uma temperatura de 70 °C e macerada com grau e pistilo (Figura 14). Em seguida, pesada (0,3 g) e tratada com uma solução de HCl 2 mol/L para rompimento da parede celular. Para auxiliar no rompimento celular, agitou-se a mistura em vortex por 2 min com posterior centrifugação a 3600 rpm por 10 min. Formaram-se três fases, onde os lipídios encontravam-se na fase inferior dissolvidos em clorofórmio, que foi evaporado e os lipídios quantificados por gravimetria, em massa seca e expressos em percentual de biomassa seca e em g/L de substratos.

Figura 13. Lipídios extraídos da levedura *R. mucilaginosa* dissolvidos em clorofórmio



Fonte: Autor (2019)

Figura 14. Biomassa de *R. mucilaginosa* seca e macerada



Fonte: Autor (2019)

4.9.4 Determinação do perfil de ácidos graxos

O óleo extraído foi transesterificado de acordo com o método padrão IUPAC 2.301 (IUPAC, 1987). Perfis cromatográficos foram registrados e o percentual dos compostos foi determinado por curva de calibração com um cromatógrafo a gas (CG) acoplado a um detector de Massa Shimadzu® GCMS-QP2010 (Kyoto, Japan) utilizando-se uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm. A temperatura do injetor e do detector foram fixadas em 230 °C e a temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 min. O gás transportador foi o hélio.

4.9.5 Carotenoides totais

A mensuração dos carotenoides totais foi feita 120 h após o inóculo. Realizou-se uma coleta de 5 mL do meio fermentado, em seguida a alíquota foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL. O sistema foi então centrifugado, o sobrenadante descartado, e às células foram adicionados 2 mL de dimetilsufóxido a 60 °C e 0,5 g de pérolas de vidro. O conjunto foi agitado em vortex por 2 min. Após esta etapa, realizou-se a incubação do sistema a 60 °C por 15 min. Logo após esse período, foram adicionados 2 mL de éter de petróleo e mais uma agitação de 2 min foi realizada. Ao fim, foram adicionados 2 mL de solução de NaCl 20% (m/v) e uma agitação em vortex foi realizada por 1 min. O conjunto foi então centrifugado a uma rotação de 3600 rpm por 10 min. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi recolhida e

submetida à leitura em espectrofotômetro (450 nm). A absorbância foi então convertida em concentração por meio da Eq. 1 (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

$$\text{Carotenoides totais} = (A \times V \times 10^4) / (a \times m) \quad (1)$$

Em que: [Carotenoides totais]: concentração de carotenoides totais em µg/g de célula;

A: absorbância a 450 nm; V: volume de extrato da amostra; a: absortividade molar da espécie química (carotenoides em geral = 2592); m: massa de amostra.

Todo o cultivo piloto seguiu as mesmas condições para o bagaço do sisal.

4.10 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKET-BURMMAN

Buscando-se determinar as variáveis que mais influenciavam na produção de carotenoides, realizou-se um planejamento Placket-Burmmman com 8 variáveis de entrada e 3 pontos centrais (Tabela 6).

Tabela 6. Matriz do planejamento experimental Placket-Burman com valores reais e codificados

Ensaio	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	EL* (g/L)	pH inicial	Temperatura (°C)	CaCl ₂	(NH ₄)SO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)
1	+1 (10,0)	-1 (0,2)	+1 (7,0)	-1 (5,0)	-1 (22,0)	-1 (0,0)	+1 (3,0)	+1 (0,5)
2	+1(10,0)	+1(0,8)	-1 (3,0)	+1 (7,0)	-1 (22,0)	-1 (0,0)	-1(1,0)	+1 (0,5)
3	-1 (6,0)	+1(0,8)	+1 (7,0)	-1 (5,0)	+1 (34)	-1 (0,0)	-1(1,0)	-1 (0,1)
4	+1(10,0)	-1 (0,2)	+1 (7,0)	+1 (7,0)	-1 (22,0)	+1 (0,2)	-1 (1,0)	-1 (0,1)
5	+1(10,0)	+1 (0,8)	-1 (3,0)	+1 (7,0)	+1 (34)	-1 (0,0)	+1 (3,0)	-1 (0,1)
6	+1(10,0)	+1(0,8)	+1 (7,0)	-1 (5,0)	+1 (34)	+1 (0,2)	-1 (1,0)	+1 (0,5)
7	-1(6,0)	+1(0,8)	+1 (7,0)	+1 (7,0)	-1 (22,0)	+1 (0,2)	+1 (3,0)	-1 (0,1)
8	-1(6,0)	-1(0,2)	+1 (7,0)	+1 (7,0)	+1 (34)	-1 (0,0)	+1 (3,0)	+1 (0,5)
9	-1(6,0)	-1(0,2)	-1 (3,0)	+1 (7,0)	+1 (34)	+1 (0,2)	-1 (1,0)	+1 (0,5)
10	+1(10,0)	-1(0,2)	-1 (3,0)	-1 (5,0)	+1 (34)	+1 (0,2)	+1 (3,0)	-1 (0,1)
11	-1(6,0)	+1(0,8)	-1 (3,0)	-1 (5,0)	-1 (24,0)	+1 (0,2)	+1 (3,0)	+1 (0,5)
12	-1(6,0)	-1(0,2)	-1 (3,0)	-1 (5,0)	-1 (24,0)	-1 (0,0)	-1 (1,0)	-1 (0,1)
13	0 (8,0)	0 (0,5)	0 (5,0)	0 (6,0)	0 (28)	0 (0,1)	0 (2,0)	0 (0,3)
14	0(8,0)	0 (0,5)	0 (5,0)	0 (6,0)	0 (28)	0 (0,1)	0 (2,0)	0 (0,3)
15	0(8,0)	0 (0,5)	0 (5,0)	0 (6,0)	0 (28)	0 (0,1)	0 (2,0)	0 (0,3)

*Extrato de levedura

O hidrolisado foi produzido com uma concentração de ácido sulfúrico equivalente a 5,5% (v/v), por 3 h em autoclave. A proporção bagaço/solução ácida foi de 1/10 (m/v). Para a adsorção dos inibidores, foi utilizada uma concentração de carvão ativo de 3% (m/v). Os procedimentos de pré-inóculo e inóculo foram análogos aos descritos no item 3.9. Nos 3 primeiros ensaios (pontos centrais), foi realizada a quantificação de biomassa e carotenoides nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. Entretanto, para os demais ensaios, apenas no tempo de 96 h, uma vez que este intervalo de tempo apresentou os mais elevados teores de biomassa e carotenoides.

4.11 COEFICIENTES DE RENDIMENTO

A produtividade celular (P_x), conversão do substrato em células ($Y_{X/S}$), conversão do substrato em lipídios ($Y_{L/S}$) e conversão do substrato em carotenoides ($Y_{C/S}$), foram determinadas de acordo com as seguintes equações:

$$P_x = \frac{(X_f - X_0)}{t} \quad (1)$$

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

$$Y_{L/S} = \frac{(L_f - L_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (3)$$

$$Y_{C/S} = \frac{(C_f - C)}{(S_0 - S_f)} \quad (4)$$

Em que:

X_f = Concentração final de células

X_0 = Concentração inicial de células

S_0 = Concentração inicial de de substrato

S_f = Concentração final de substrato

L_f = Concentração inicial de lipídios

L_0 = Concentração final de lipídios

C_f = Concentração inicial de carotenoides

C = Concentração final de lipídios

t = Tempo

REFERÊNCIAS

- AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219-1227, 2011.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107-113, 2007.
- AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; SALA, M.; RONCAGLIA, L.; LUCIA, M.; LEONARDI, A.; ROSSI, M. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p.73-78, 2010.
- ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBAACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3051–3056, 2008.
- BANZATTO, D. FREITA, L. MUTTON, M. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup, **Food Science and Technology**, v. 33, p. 14–18, 2013.
- BERERA, R. The light-harvesting function of carotenoids in the cyanobacterial stress-inducible isia complex. **Chemical Physics**, v. 373, p. 65–70, 2010.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 91, p. 692–696, 2009.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 1193-1203, 2011.
- BESARAB, N. V. GERASIMOVICH, K. M; KANTEROVA, A. V. NOVIK, G. I. Biosynthetic production of carotenoids using yeast strains of genus *Rhodotorula* on the cheap beer wort substrate. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, p. 383-386, 2018.
- BEZERRA, G. S. **Avaliação da produção simultânea de xilitol e etanol a partir do bagaço de sisal**. 80f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 565-571, 2004.
- BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BOTURA, M. B.; SANTOS, J.D.; SILVA, J.D.; LIMA, H.G.; OLIVEIRA, J.V.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M.; BRANCO, A. In vitro ovicidal and larvicidal activity of

Agave sisalana (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 211-217, 2013.

BOUSSIBA, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 108, p. 111–117, 2000.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Conjuntura especial. Sisal 2015-retrospectiva**, 2015.

CAMPENNI', L.; NOBRE, B. P.; SANTOS, C. A.; OLIVEIRA, A. C.; AIRESBARROS, M. R.; PALAVRA, A. M. F.; GOUVEIA, L. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 1383–93, 2013.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S. ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

CARRILHO, A. K. T.; CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49–73, 2014.

CHANDI, G.; SINGH, S.; GILL, B. Optimization of carotenoids by *Rhodotorula glutinis*. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 881–887, 2010.

CHENG, Y. T.; YANG, C. F. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 61, p. 270–275, 2016.

CHEN, X.; CHEN, R.; GU, Z.; LI, C.; LI, P. The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1580-1584, 2007.

CIPOLATTI, E. P.; REMEDI, R. D.; SÁ, C. S.; RODRIGUES, A. B.; RAMOS, J. M. G.; BURKERT, C. A. V.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M. Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101-108, 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Cultura Permanente do sisal, Março 2018.

CORREA, B. A.; PARREIRA, M. C.; MARTINS, J. S.; RIBEIRO, R. C.; SILVA, E. V. Reaproveitamento de resíduos orgânicos regionais agroindustriais da Amazônia tocantina como substratos alternativos na produção de mudas de alface. **Revista brasileira de agropecuária sustentável**, v. 9, p. 97-104, 2019.

CUTZU, R.; COI, A.; ROSSO, F.; BARDI, L.; CIANI, M.; BUDRONI, M.; ZARA, G.; ZARA, S.; MANNAZZU, I. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1009-1017, 2013.

DEBNATH, M.; PANDEY, M. SHARMA, R.; THAKUR, G. S.; LAL, P. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 43, p. 177–187, 2010.

DIAS, A. B.; CUNHA, A. L.; SILVA, A. O.; OLIVEIRA, I.F. Potencial de indicação geográfica do sisal na Bahia. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, p. 174-181, 2015.

DWORECKA-KASZAK, B.; KIZERWETTER-SWIDA, M. Pseudomycelium forming *Rhodotorula*–unusual picture of biofilm. **Mikologia Lekarska**, v. 18, p. 74–78, 2011.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL, A. H.; MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R. H.; RUSSELL, D. W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; VAN MEER, G.; VANNIEUWENHZE, M. S.; WHITE, S. H.; WITZTUM, J. L.; DENNIS, E. A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 839–862, 2005.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - 2016 -Disponível em <http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/> Acesso em 22.07.2016.

FEDERICI, F.; FAVA, F.; KALOGERAKISC, . N.; MANTZAVINOSC, D. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 895–900, 2009.

FIGUEIROA, D. S. **Avaliação de pré-tratamentos químicos no bagaço do sisal**. 110 f. Tese (doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2017.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R.S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1165-1171, 2011.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, B. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 163-180, 2009.

GAO, Q.; CUI, Z.; ZHANG, J.; BAO, J. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource Technology**, v. 152, p.552–556, 2014.

GERELMAA, Z.; ZULTSETSEG, C. H.; BATJARGAL, B.; RENTSENKHAND, T. S. Selection of culture media for the production of carotenoids with antioxidant activity by *Rhodotorula glutinis*. **Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences**, v. 58, p. 31-38, 2018.

GIRARD, J.-M.; ROY, M.-L.; BEN, M.; GAGNON, J.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M. E.; TREMBLAY, R.; DESCHÊNES, J.-S.. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Research**, v. 5, p. 241–248, 2014.

HALFHIDE, T.; ÅKERSTRØM, A.; IVAR, O.; RAGNAR, H.; ERGAS, S. J. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. **Algal Research**, v. 6, p. 152–159, 2014.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br>>, acesso em 22/10/2019.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard Methods for the analysis of oils fats and derivatives, 6th international union of pure and Applied Chemistry, 6th Edition (Method IID 19) Pergamon Press Oxford Part I (Sections 1 and 22), p. 96-102, 1987.

MEGIATTO, J. D.; HOAREAU, W.; GARDRAT, C.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Sisal fibers: Surface chemical modification using reagent obtained from a renewable source: Characterization of hemicellulose and lignin as model study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8576-8584, 2007.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7988–7990, 2010.

KIM, D.; VIJAYAN, D.; PRAVEENKUMAR, R.; HAN, J.; LEE, K.; PARK, J.; CHANG, W.; LEE, J.; OH, Y. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 300–310, 2016.

KOT, A. M.; BŁAŻEJAK, S.; KURCZ, A.; BRYŚ, J.; GIENKA, I.; BZDUCHA-WRÓBEL, A.; MALISZEWSKA, M.; RECZEK, L. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 25–31, 2017.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167–199, 2003.

LEYTON, A.; FLORES, L.; MEAKI-ARVELA, P.; LIENQUEO, M. E.; SHENE, C. Macrocytis pyrifera source of nutrients for the production of carotenoids by a marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p. 1069-1079, 2019.

LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 395–408, 2013.

LIBKIND, D.; GADANHO, M.; BROOCK, M.; SAMPAIO, J. P. Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 93-98, 2008.

LIMA, C. S. S.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. L. H.; LIMA, E. E.; CONRADO, L. S.; LEÃO, D. A. S. 2013. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy**, v. 102, p. 254–259, 2013.

LI, M.; LIU, G. L.; CHI, Z.; CHI, Z. M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 101-107, 2010.

LIU, J.; HUANG, J.; JIANG, Y.; CHEN, F. Bioresource Technology Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 393–398, 2012.

MACHADO, W. R. C.; SILVA, L. C.; VANZELA, E. S. L.; DEL BIANCHI, V. L. Evaluation of the process conditions for the production of microbial carotenoids by the recently isolated *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1-14, 2019.

MACHADO, W. R. C.; SOARES, A.B.V.; BIANCHI, V.L. Produção de carotenoides por meio de fermentação em estado sólido com *Rhodotorula mucilaginosa* em bagaço de laranja (*Citrus sinensis*). **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 11, p. 48-57, 2019.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2281–2287, 2007.

MANIMALA, M.; MURUGESAN, R. Studies on carotenoid pigment production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cheap materials of agro-industrial origin. **The Pharma Innovation Journal**. v. 6, p. 80-82, 2017.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 93-100, 2001.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 732–738, 2015.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A. Use of several wastes substrates for carotenoid-rich yeast biomass production, **Journal of Environmental Management**. v. 95, p. 5338-5342, 2012.

MENDES NETO, A. O. Placas de sinalização em matriz polimérica com reforço de fibras de sisal. 213 f, Tese (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense, 2008.

MENDONÇA, J. O.; ANDRADE, R. ; BRANDÃO, W. Situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento. **Revista Bahia Agrícola**, v. 9, 2011.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1–5, 2009.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. **Journal of Chemistry**, v. 16, p. 1-16, 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

Analitical Chemistry, v. 31, p. 426 – 428, 1959.

MISHRA, S.; MOHANTY, A. K.; DRZAL, L. T.; MISRA, M.; HINRICHSEN, G. A Review on pineapple leaf fibers, sisal fibers and their biocomposites. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 289, p. 955-974, 2004.

MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J. (HANS); LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 40–48, 2012.

MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; BROOCK, M. Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. **Methods in Molecular Biology**, v. 898, p. 275-283, 2012.

MORAIS, F. L. **Carotenoides: Características biológicas e químicas**. 2006, 70 f. Monografia (Especialização), curso de especialização em qualidade em alimentos. Universidade de Brasília, 2006.

MOREIRA, M. D.; MELO, M. M.; COIMBRA, J. M.; REIS, K. C.; SCHWANA, R. F.; SILVA, C. F. Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. **Waste Management**, v. 82, p. 93-99, 2018.

MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p.154–157, 2010.

NAVES, I. **Sisal Brasil**. Câmara Setorial de Fibras Naturais – CSFN, 2018. Workshop cadeia produtiva do sisal, 2018.

NARAYAN, M. S.; MANOJ, G. P.; VATCHRAVELU, K.; BHAGYALAKSHMI, N.; MAHADEVASWAMY, M. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 56, n. 7, p. 521–8, 2005.

O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 34, n. 1, p. 121–5, 2011.

ORDOG, V.; STIRK, W. A.; BALINT, P.; LOVASZ, C.; PULZ, O.; VAN STADEN, J. Lipid productivity and fatty acid composition in *Chlorella* and *Scenedesmus* strains grown in nitrogen-stressed conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p.233–243, 2013.

OTERO, D. M.; BULSING, B. A.; HUERTA, K. M.; ROSA, C. A.; ZAMBIAZI, R. C.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Carotenoid-Producing yeasts in the brazilian biodiversity: isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 1-17, 2019.

PAIVA, F. F. G.; MARIA, V. P. K. Gestão ambiental de resíduos industriais: análise de gestão e reaproveitamento de resíduos da indústria sucroalcooleira. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 5, p. 157-166, 2018.

PAN, L. X.; YANG, D. F.; SHAO, L.; LI, W.; CHEN, G. G.; LIANG, Z. Q. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 215–220, 2009.

PECHINSKII, S. V.; KUREGYAN, A. G. The impact of carotenoids on immunity (review), **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 47, p. 509-513, 2014.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, p.118-127, 2007.

PEREIRA, R. N.; SILVEIRA, J. M.; BURKERT, J. F. M.; ORES, J. C.; BURKERT, C A. V. Simultaneous lipid and carotenoid production by stepwise fed-batch cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* with crude glycerol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 1099-1108, 2019.

PETRIK, S.; OBRUČA, S.; BENEŠOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast 55 strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 307–315, 2014.

PIROZZI, D.; AUSIELLO, A.; ZUCCARO, G.; SANNINO, F.; YOUSUF, A. Culture of oleaginous yeasts in dairy industry wastewaters to obtain lipids suitable for the production of II-generation biodiesel. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.7, p. 4-26, 2013.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 1047–1050, 2002.

RIBEIRO, E. P. SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. 2ª edição. São Paulo: Edgard Blucher, 2007, 184 p.

RIBEIRO E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgar Blucher Ltda, 1ª edição, São Paulo, p. 155-157, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis. **Harvestbook Technical Monograph**, 2004.

RODRIGUES, D. B.; FLORES, D. B.; BARIN, J. S.; MERCADANTE, A. Z.; JACOBLOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, p. 144–148, 2014.

RYU, B.; KIM, J.; KIM, K.; CHOI, Y.; HAN, J.; YANG, J. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 357–364, 2013.

SANCHES POTES, A.; KIRCHNGR SALINAS, F. R.; LOPEZ GONSÁLEZ, E.; PAULIN TORRES, N.; USAMI OLMOS, C. **Manuales para educación agropecuária: cultivos de fibras**. México: Trillas, 84p, 1991.

SANTOS, J. D. G.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO R.; E BRANCO, A. Chemicals from *Agave sisalana* biomass: Isolation and identification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 8761-8771, 2015.

SANTOS, L.; KOTOVICZ, V.; BARANA, A. C.; ALMEIDA, M. M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori* (agroindustrial wastes utilization to glucoamylase production by *Aspergillus awamori*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, p. 655–664, 2013.

SANTOS, R. C.; DIOGO, R. A.; FONTANA, J. D.; BONFIN, T. M. B. Carotenoid production by *Halophilic archaea* under different culture conditions. **Current Microbiology**, v. 72, p. 641-651, 2016.

SCHNEIDER, T.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N.; CLAUPEIN, W.; HETRICK, M.; PHAM, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p. 34–43, 2013.

SHARMA, R.; GHOSHAL. G. Optimization of carotenoids production by *rhodotorula mucilaginosa* (mtcc-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. 1-11, 2020.

SILVA, C.M.; BORBA, T.M.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, p. 1-15, 2012.

SILVA, J.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S.F.M.; RIBEIRO, J. E. S.; MEDEIROS, L. L. FERREIRA, A. L. O. Produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 1-6, 2018.

SILVA, O. R. F. F.; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V.; SOFIATTI, V.; FILHO, J. L. S.; CARVALHO, O. S. COSTA, L. B. Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. Circular Técnica Campina Grande, PB, n. 123, jul. 2008.

Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-200909/22318/1/CIRTEC123.pdf>>, acesso em 25/07/2016.

SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1336–1360, 2014.

SONG, M. M.; PEI, H.Y.; HU, W.R.; MA, G. X. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.141, p.245–251, 2013.

SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto na síntese de biodiesel**. 190 f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2014.

SUN, Z. ZHOU, Z-G.; GERKEN, H.; CHEN, F.; LIU, J. Screening and characterization of oleaginous *Chlorella* strains and exploration of photoautotrophic *Chlorella protothecoides* for oil production. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 53–62, 2015.

TKÁČOVÁ, J.; ČAPLOVÁ, J.; KLEMPOVÁ, T.; ČERTÍK, M. Correlation between lipid and carotenoid synthesis in torularhodin-producing *Rhodotorula glutinis*. **Annals of Microbiology** v. 67, p. 541–551, 2017.

THIRU, M.; SANKH, S.; RANGASWAMY, V. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10436–10440, 2011.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2551–2557, 2005.

VILLARREAL, M. L. M.; SILVA, A. J. B.; CANETTIERI, E. V.; FILHO, I. H. J. Avaliação da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto com carvão ativo. **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável**, p. 4644-4653, 2005.

WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3307–3329, 2014.

WYMAN, C. E.; Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and Power. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 254–262, 2003.

XUE, F.; GAO, B.; ZHU, Y.; ZHANG, X.; FENG, W.; TAN, T. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6092–6095, 2010.

XUE, F.; ZHANG, X.; LUO, H.; TAN, T. A new method for preparing raw material for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1699–1702, 2006.

YAN, D.; LU, Y.; CHEN, Y-F.; WU, Q. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 11, p. 6487–93, 2011.

YOLMEH, M., KHOMEIRI, M. Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 285-290, 2017.

ZENI, J.; CENSE, K.; GRANDO, C. E.; TIGGERMANN, L.; COLET, R.; LERIN, L. A.; CANSIAN, R. L.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Screening of pectinase-producing microorganisms with polygalacturonase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 383-392, 2011.

ZHAO, C.; ZHANG, T.; LI, M.; CHI, Z. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1121–1126, 2010.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos originais, intitulados:

ARTIGO I – “Carotenoids and fatty acids production by *Rhodotorula mucilaginosa* grown on sisal fiber hydrolyzate”. Submetido ao periódico *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*” (ISSN: 1878-8181).

ARTIGO II – “Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate”. “Submetido ao periódico *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*” (ISSN: 1878-8181).

Depósito de patente: A partir dos resultados obtidos, foi depositada também uma patente intitulada: “Processo de produção de carotenoides utilizando leveduras do gênero *Rhodotorula* e o hidrolisado do sisal como substrato” (Apêndice I).

ARTIGO 1

Carotenoids and fatty acids production by *Rhodotorula mucilaginosa* grown on sisal (*Agave sisalana*) fiber hydrolyzate

Josevan da Silva^{*a}, Flávio Luiz Honorato da Silva^b, Ellen Alves dos Santos^b, Willyan Araújo da Costa^b, Lorena Lucena de Medeiros^a, José Evangelista Santos Ribeiro^a

^a Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^b Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

*Autor para correspondência: josevanufpb@gmail.com

ABSTRACT: Due to the large amounts of cellulose and lignin, sisal fiber has potential to be used in the production of hydrolyzates, which can be used as substrate to obtain biocomposites from the biomass produced. The present research aimed to produce biomass, lipids and carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* yeast, by using the sisal fiber hydrolyzate as substrate. Yeast cells were inoculated in the sisal fiber hydrolyzate and the cultures were incubated in an orbital Shaker at 30 °C and 200 rpm. During the time interval of 120 h, biomass and reducing sugars present in the culture were quantified. Overall, 4.98 g L⁻¹ of biomass, 19.28% of lipids and 0.48 mg L⁻¹ of carotenoids were produced. Sisal fiber hydrolyzate was shown to be an adequate medium for the production of lipids and carotenoids by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*.

Keywords: lipids; adsorption; yeast; bioprocess; lignocellulosic material.

1. Introduction

The use of lignocellulosic biomass raw material for the production of biocomposites has been increasingly consolidated. These materials have a very characteristic composition, since they have in their biochemical composition basically cellulose, lignin and hemicellulose in proportions that vary for each type of material and time/place of collection (Canilha et al., 2012).

A plant mostly composed of lignocellulosic materials is sisal (*Agave sisalana*), a cultivar of great economic interest in hot climates and arid regions such as Northeastern Brazil, with plantations concentrated mainly in the states of Bahia and Paraíba. Sisal fiber contains about 90% fermentable sugar-generating materials (Debnath et al., 2010).

Currently, only 4% of sisal leaves are used to make fiber, which is used to make handicrafts, brooms, bags, purses, hats, twines, ropes, mats and carpets, as well as pulp for paper production. Kraft (high strength) and other types of thin paper (for cigarette, filter, dielectric paper, sanitary pad, diaper, etc.) (Maran & Prya, 2015). An alternative use of fiber is its use for the production of biocomposites, by using yeasts, since some microorganisms are able to convert a source of carbon, when in excess, into high value metabolites (lipids and carotenoids) inside their cells (Beopoulos et al., 2011).

A wide variety of vegetable oils (canola, soybean, corn, cotton, sunflower) have been used by the food industry, but there is a search for alternative and renewable sources of oils with a quality and fatty acid profile similar or superior to those of vegetable origin, thus several microorganisms have been tested, mainly microalgae and yeast (Sun et al., 2015; Xue et al., 2010). In addition, lipids derived from oleaginous are being considered as promising raw material for the production of biofuels (Dasgupta et al., 2017).

Other biocomposites are carotenoids, which are pigments obtained almost exclusively by chemical processes. However, biotechnological production has been gaining prominence, standing out due to the possibility of using inexpensive substrates, independence of environmental conditions and the need for less space for production (Zeni et al., 2011). Several wastes, such as whey, potato extract (Marova et al., 2012), parboiled rice water and crude glycerol (Otero et al., 2019) have been studied for the synthesis of carotenoids by yeasts and the optimization of cultivation conditions has been one of the strategies used to increase the production of carotenoids and therefore the process viability (Santos et al., 2016).

The use of an inexpensive raw material as a substrate for the production of substances of interest in the industry is a good alternative for adding value to these materials. Thus, this research aimed to produce lipids and carotenoids using sisal fiber hydrolyzate as substrate. The successful use of sisal hydrolyzate may allow to cut the costs of production of these valuable compounds as well as could help to add value to sisal fiber.

2. Material and method

2.1 Sisal fiber

Sisal fiber was obtained in Cuité-PB, latitude: 06° 29 '01" S, length: 36° 09 '13 "W, cut into small pieces, with a scissor help, to facilitate hydrolysis process.

2.1.1 Sisal fiber thermogravimetric characterization

The sisal fiber composition was determinate by thermogravimetry. It was used a thermogravimetric balance (Shimadzu Thermal Analyzer) which was heated from 25 °C to 1000 °C at a 10 °C.min⁻¹ heating rate in a nitrogen atmosphere, flow of 25 mL.min⁻¹.

2.2 Sisal fiber hydrolyzate production

In an Erlenmeyer of 2 L, were added 50 g of sisal fiber and 500 mL of 5.5% sulfuric acid solution. Hydrolysis was performed in autoclave under pressure of 1 atm, temperature of 121 °C, for 1 h. At the end of the hydrolysis process, the filtrate (hydrolyzate) was collected and the waste was discarded.

2.3 Treatment of hydrolyzate

The sisal fiber liquor was subjected to an adsorption process to remove inhibitors formed during the hydrolysis processes. Activated carbon (Vetec) was used in this stage at a 5 % mass/volume ratio (Villarreal, 2005).

2.4 Determination of sugars and fermentation inhibitors

Carbohydrate and inhibitors contents were determined by High Performance Liquid Chromatography (VARIAN, Waters, Califórnia,USA), coupled with a refractive index detector (Varian 356 - LC), equipped with isocratic solvent system, "Rheodyne" valve with 20 µL; coupled with an Agilent column Hi-Plex H (300 mm x 7.7 mm) was used. Samples were investigated at temperature of 65 °C, mobile phase composed of ultra pure water, flow rate of 0.6 mL/min, injecting 20 µL of sample and analysis time of 60 min. The chromatograms of

samples were compared with standards of sugars analyzed, and quantification was performed by the compound area in a calibration curve of each compound. Total contents of sugars (cellobiose, glucose, xylose and arabinose) and inhibitors (acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural) were assessed.

2.5 Microorganism

R. mucilaginosa CCT 3892 yeast was obtained from the André Tosello Foundation, Collection of Tropical Cultures of São Paulo. The yeast was acquired in the activated form. For growth and maintenance, colonies were incubated in Petri dishes with YMA medium (Yeast, Malt, Agar) composed of 10 g L⁻¹ glucose, 3 g L⁻¹ of yeast extract, 3 g L⁻¹ of malt extract, 5 g L⁻¹ of bacto peptone and 20 g L⁻¹ of agar. Petri dishes were incubated in oven at 30 °C. For maintenance, yeasts were stored on plates in refrigerator at 4 °C.

2.6 Pre-inoculum

Sterile distilled water (5 mL) was added to a Petri dish containing the *R. mucilaginosa* yeast, scraping the cells to form a suspension. The cell suspension was transferred to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 200 mL of the medium used for the synthetic culture (Yeast Malt medium). After adding the inoculum, the Erlenmeyer flask was taken to a rotary shaker incubator at 30 °C and 200 rpm for 24 h.

2.7 Cultivation

After 24 h from the start of the pre-inoculum, the medium was centrifuged and the supernatant discarded, 50 mL of sterile distilled water were added, and the cell concentration was determined in a Neubauer chamber to calculate the volume of inoculum corresponding to 1x10⁷ cells.mL⁻¹. This cell volume was inoculated into 300 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of sisal fiber hydrolyzate. Erlenmeyer flasks were incubated on a rotary shaker incubator at 30 °C and 200 rpm for 120 h. The culture was carried out in triplicate.

2.8 Analytical Methods

2.8.1. Cell Growth

During the time intervals of 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h, 2 mL aliquots of the medium were collected. The biomass was quantified by measuring the turbidity of the diluted sample by spectrophotometry at 600 nm with a standard absorbance curve versus dry cell concentration (Aksu; Eren, 2007).

2.8.2 Yield coefficients

The cellular productivity (P_x), substrate conversion into cells ($Y_{X/S}$), the substrate conversion into lipid ($Y_{L/S}$) and the carotenoid conversion ($Y_{C/S}$) were determined according with the following equations:

$$P_x = \frac{(X_f - X_0)}{t} \quad (1)$$

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

$$Y_{L/S} = \frac{(L_f - L_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (3)$$

$$Y_{C/S} = \frac{(C_f - C_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (4)$$

Where X, S, L, C and t corresponds to the cellular concentration, substrate concentration, lipid concentration, carotenoid concentration and time of cultivation, respectively. The subscribe f and 0 indicates that the variable was measured at the final or initial cultivation time, respectively.

2.8.3 Substrate consumption

During the established time intervals, aliquots of the culture medium were collected to measure the content of sugars using High Performance Liquid Chromatograph (VARIAN, Waters, California, USA), coupled with a refractive index detector (Varian 356 – LC) and equipped with an isocratic solvent system. An Agilent column Hi-plex H (300 mm x 7.7 mm) was used. The flow rate applied was 0.6 mL/min, at a temperature of 85 °C, with a running time of 30 min. The mobile phase used was ultrapure water. 2.8.4 Extraction, quantification and fatty acid profile of lipids total lipid extraction was performed using the Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959), modified by Manirakiza et al. (2001).

2.8.5 Fatty acid profile determination

The oil extracted was transesterified according to IUPAC 2.301 standard method (IUPAC, 1987). Chromatographic profiles were recorded, and the percentage of compounds was determined against a calibration curve using a gas chromatograph (GC) coupled to a mass detector (Shimadzu® GCMS-QP2010, Kyoto, Japan) equipped with a Durabound DB-23 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm column. The injector and detector temperature were set to 230 °C,

and the column temperature was 90 °C. The elution gradient in the column followed three different ramps: 90 to 150 °C (10 °C/min), 150 to 200 °C (5 °C/min) and 200 to 230 °C (3 °C/min), over a total of 34 min. Helium was used as carrier gas.

2.8.6 Determination of total carotenoids

Total carotenoids were measured at 96 h after the inoculum, the time of the highest biomass production. An aliquot of 5 mL of the culture medium was collected and centrifuged (2260×g for 5 min), the supernatant was discarded and the biomass was re-suspended in 2 mL DMSO pre-heated at 60 °C, added with glass beads (0.5 g), vortexed for 2 min and incubated at 60 °C for 15 min. Then, 2 mL acetone, 2 mL petroleum ether and 2 mL NaCl 20% were sequentially added, the mixture was vortexed for a total time of 5 minutes and centrifuged at 2260×g for 10 min. The upper petroleum ether (PE) layer containing the extracted carotenoids was collected and the total carotenoids were quantified as β -carotene equivalents by using a spectrophotometer at 450 nm wavelength, according to Rodriguez-Amaya and Kimura (2004).

3. Results and discussion

3.1 Thermogravimetric characterization of sisal fiber

According to the sisal fiber thermogravimetric curve (TG) (Fig 1), the moisture content obtained in the thermogravimetric characterization of sisal fiber was similar to that of Lima et al. (2013), in the sisal fiber characterization, which obtained 5.7% (Table 1). Regarding the lignin content, corresponding to 27.6%, the value of the present study was well above that reported by those authors (13.5%), whereas the content of hemicellulose was lower. The high cellulose content obtained stands out, since the hydrolysis of this polysaccharide gives rise to several sugars that can be used by microorganisms to produce biocompounds.

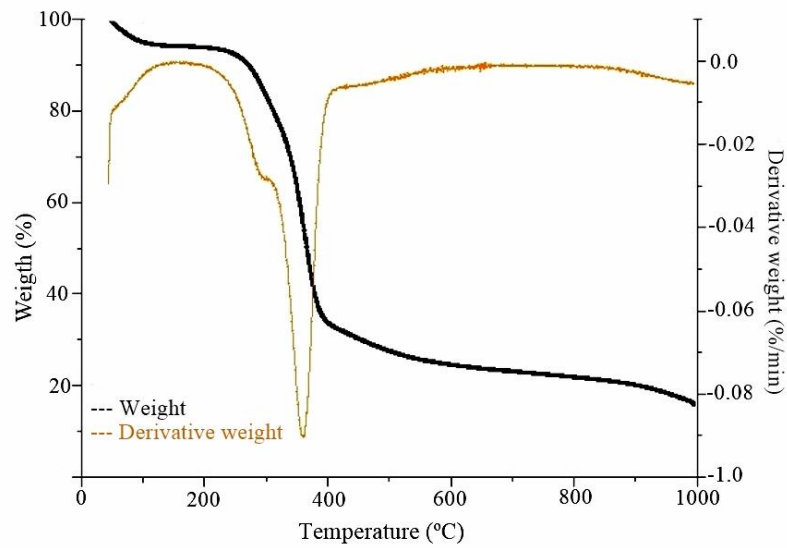


Figure 1 - Sisal fiber thermogravimetric characterization (TG) and its derivative curve (DTG)

Table 1 - Thermogravimetric characterization of sisal fiber

Component	Quantification (%)
Moisture	5.05
Lignin	27.60
Hemicellulose	13.21
Cellulose	27.35
Ash	16.00

The high ash content characterizes sisal fiber as an excellent source of minerals, indispensable nutrients, either for yeast growth or the accumulation of biocomposites. These changes in the ash and lignin contents can be justified by some factors such as soil type, climate and other aspects related to the climatic conditions of sisal cultivation.

3.2 Determination of sugars and fermentation inhibitors

The production of a sisal hydrolyzate rich in xylose and other sugars easily metabolizable by microorganisms (Table 2) is of fundamental importance for the development of a bioprocess involving biorefinery (Medeiros et al., 2018).

Table 2 - Sugars and inhibitors in the sisal fiber hydrolysate

Component	Concentration (g/L)
Cellobiose	0.0
Glucose	2.36
Xylose	13.72
Arabinose	0.0
Acetic acid	2.29

3.3 Biomass produced and carbon source consumption

The maximum biomass, equivalent to 4.98 g L^{-1} , was produced 96 h after the inoculum (Figure 2). This result is a little lower to that found by Reyna-Martinez et al. (2015), which produced 6.27 g L^{-1} when they cultured *R. mucilaginosa* yeast, however, a synthetic medium based on glucose, yeast extract and peptone was used. The biomass produced in this study was slightly lower than that obtained by Marova et al. (2012), which produced 7.70 g L^{-1} of dry biomass of *R. mucilaginosa* using medium based on potato extract.

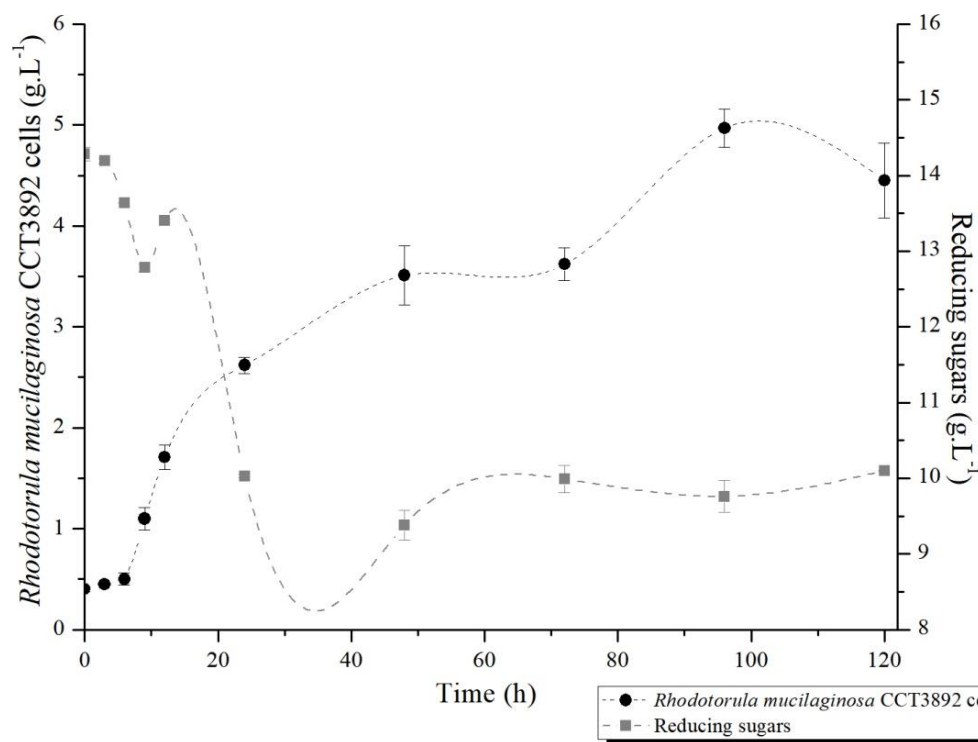


Figure 2 – Cell growth and consumption of carbon source of *R. mucilaginosa* yeast in hydrolysed sisal fiber.

Cheng and Yang (2016) obtained approximately 6 g L⁻¹ biomass using a mixture of cane molasses and residue supplemented with yeast extract as a substrate at pH 4. The addition of a nitrogen source to the culture medium may have had significant influence on the growth of *R. mucilaginosa* yeast, thus, it can be suggested that the biomass produced in the present study can be increased, since sisal fiber hydrolysate was used as the sole source of nutrients.

Approximately 33% of the reducing sugar was consumed (Fig. 2), resulting in a biomass sugar conversion coefficient ($Y_{x/s}$) of 0.93 (g.g⁻¹) *R. mucilaginosa* yeast. The increase in reducing sugar content between 9 and 12 h may be explained by the presence of enzymes in oil yeast, which have the ability to hydrolyze the most complex carbohydrates into simple sugars. Then, there was a rapid decrease in the concentration of reducing sugars, coinciding with the logarithmic phase of yeast growth.

After 24 h, there was practically no reduction of the carbon source, although the microorganism development had not yet ceased, this may possibly be justified by the presence

of enzymes in the yeast capable of hydrolyzing non-reducing sugars, releasing glucose and other reducing sugars in the medium.

3.3 Lipids and carotenoids production

The lipid production by *R. mucilaginosa* yeast cultivated in the sisal fiber hydrolyzate (Table 3) was similar to that obtained by Reyna-Martínez et al. (2015), which produced 20.84 g (100 g)⁻¹ lipids in dry biomass, using *R. mucilaginosa* yeast and a synthetic medium based on glucose, yeast extract and peptone. The lipid productivity with respect to the carbon source (0.21 g.g⁻¹) was higher than that obtained by Zhao et al. (2011), 0.11 g.g⁻¹, using artichoke tubers as medium extract.

Table 3 - Lipids and carotenoids production and respective yield coefficients

Products	Quantification	Yield coefficients*
Lipids (%)	19.28 ± 0.26	0.21 g.g ⁻¹
Carotenoids (mg L ⁻¹)	0.49 ± 0.07	0.11 mg.g ⁻¹

* Productivity coefficients with respect to the carbon source

The volumetric carotenoid production (0.49 mg L⁻¹) was equivalent to 98.6 µg/g (specific production carotenoid). This production is similar to that obtained in one of the conditions of the study by Lopes et al. (2017), who investigated the influence of different cellular rupture methods on carotenoids extraction, when acetic acid was used as the chemical breaking agent, and 93.2 µg.g⁻¹ of carotenoids were obtained.

The carotenoid production of the present study was much higher than that of Naghavi et al. (2013), who obtained 0.29 mg L⁻¹ using *R. mucilaginosa* yeast and a synthetic culture medium. In this study, each gram of the carbon source used was converted into 0.21 mg of carotenoids, and this yield could be improved by optimizing some parameters influencing accumulation, such as pH, cultivation temperature and light incidence.

Carotenoids extracted from oleaginous yeasts have potential to be applied in food supplements, colorant agents, ration, pharmaceuticals, among others. Tests have been carried out with dyes extracted from yeasts in food production as reported by Elsanhoty et al. (2017), the authors used the carotenoids extracted from of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* for use as colorant agent in the production of sweet candy jelly.

3.4 Fatty acids profile

The oil profile is very similar to that obtained from oleaginous yeasts as a source of saturated and unsaturated fatty acids, but with a predominance of unsaturated fatty acids (Table 4). The lipid profile of the present study is similar to *R. glutinis* oil obtained from Ribeiro et al. (2019), the authors cultivated the yeast in cassava wastewater, getting a predominance of unsaturated fatty acids, and oleic as the predominant.

Table 4 - Fatty acids profile of the oil extracted from the biomass produced in the sisal fiber hydrolyzate

Fatty acid	%
Myristic acid (C14:0)	1.02
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.49
Palmitic acid (C16:0)	14.89
Palmitoleic acid (C16:1)	0.52
Heptadecanoic acid (C17:0)	1.22
Cis-10-heptadecenoic acid (C17:1)	0.48
Stearic acid (C18:0)	10.60
Oleic acid (C18:1n9c)	41.99
Linoleic acid (C18:2n6c)	21.03
Alfa -linolenic acid (C18:3n3)	5.61
Behenic acid (C22:0)	0.66
Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA)	0.96
Total	100.00

The fatty acid profile of the present research is consistent to Papanikolau and Aggelis (2011) because oleaginous yeasts are able to produce lipids with fatty acids profiles similar to those of vegetable oils, with saturated and monounsaturated fatty acids, mainly those containing from 16 to 18 carbon atoms in the chain.

No short-chain fatty acids were detected, since the smaller chain was myristic acid (C14:0). The predominant fatty acids were oleic acid (C18:1n9c) and linoleic acid (C18:2n6c). The presence of linolenic acid (C18:3n3) and linoleic acid, both belonging to the omega family, present nutritional and medicinal properties that deserve attention.

In the lipid profile of the oil obtained by Gientka et al. (2017), using *R. mucilaginosa* yeast, oleic acid (C18:1) was also predominant, being responsible for 36.6 % of the total fatty acids. The percentage of linoleic acid (C18:2) was equivalent to 15.8 %, but both were lower than those detected in the present study. Kot et al. (2019) studied the effect of stress on lipid accumulation in yeasts cultured in agroindustrial wastes. The authors found more than 40% for oleic acid, independently of the applied stress. This fatty acid, besides being essential for human nutrition, also arouses interest in the production of biodiesel (Knothe, 2005).

4. Conclusions

According with the prominent results found in this research, sisal fiber hydrolyzate proved to be an adequate substrate for biomass, lipids and carotenoids production, because the sisal fiber hydrolyzate was used as a single source of nutrients, without the need for supplementation with glucose and minerals, for example. However, this production can be improved with a study of the variables involved in the process, such as temperature, pH, nitrogen source, agitation and aeration rates, among others. The fatty acids profile of the lipids produced by the yeast in this residue, predominantly long-chain fatty acids, especially oleic and linoleic acids, characterizes the oil obtained as high quality, making it potentially applicable in a lot of different industrial sectors, such as food, pharmaceutical, chemical and cosmetics.

Acknowledgments

The authors thank the financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the André Tosello Foundation for the donation of the microorganism.

References

- Aksu, Z., Eren, A.T., 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochem. Engin. J. 35, 107-113.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.M., Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10, 1193-1203.

- Bligh, E.G., Dyer, J.W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Canilha, L., Chandel, A.K., Milessi, T.S.S., Antunes, F.A.F., Freitas, V.L.C., Felipe, M.G.A., Silva, S.S., 2012. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1-15.
- Cheng, Y.T., Yang, C.F., 2016. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Jour. of the Taiw. Inst. Chem. Eng.* 20, 1-6.
- Dasgupta, D., Sharma, T., Bhatt, A., Bandhu, S., Ghosh, D., 2017. Cultivation of oleaginous yeast *Rhodotorula mucilaginosa* IIPL32 in split column airlift reactor and its influence on fuel properties. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 10, 308-316.
- Debnath, M., Pandey, M., Sharma, R., Thakur, G.S., Lal, P., 2010. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. *J. Med. Plant. Res.* 43, 177–187.
- Elsanhoty, R.M., Al-Turki, A.I., El-Razik, M.M.A. 2017. Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. *J. food Agric. Environ.* 15, 21-26.
- Gientka, I., Gadaszewska, M., Błazejak, S., Kieliszek, M., Bzducha-Wrobel, A., Stasiak-Rozanska, L., Kot, A.M., 2017. Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in médium with glycerol. *Europ. Food Res. Technol.* 243, 275-286.
- IUPAC, 1987. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standart Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 6th International Union of Pure and Applied Chemistry, 6th Edition (Method II.D. 19) Pergamon Press, Oxford, Part I (Sections 1 and 22), 96-102.

- Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* 86, 1059–1070.
- Kot, A.M., Błazejak, S., Kieliszek, M., Gientka, I., Brys, J., Reczek, L., Pobiega, K., 2019. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1–10.
- Lima, C.S.S., Conceição, M.M., Silva, F.L.H., Lima, E.E., Conrado, L.S., Leão, D.A.S., 2013. Characterization of acid hydrolysis of sisal. *Appl. Energ.* 102, 254–259.
- Lopes, N.A., Remedi, R.D., Sá, C.S., Burkert, C.A.V., Burkert, J.F.M., 2017, Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*, *Food Sci. biotechnol.* 26, 759-766.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P., 2001, Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *J. Food Compos. Anal.* 14, 93-100.
- Maran, J. P.; Priya, B., 2015. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydr. Polym.* 115, 732–738.
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., Haronikova, A., 2012. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *J. environ. Manag.* 95, 5338-5342.
- Medeiros, L.L, Da Silva, F.L.H., Da Conceição, M.M., Conrado, L.S., Madruga, M.S., da Costa, W.A., Bezerra, T.K.A. 2018. Efficient hydrolysis of cellulosic biomass into free sugars for a future development processing a biorefinery contexto. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16, 448–452.

- Naghavi, F.S., Hanachi, P., Soudi, M.R., Saboora, A., Ghorbani, A., 2013. Evaluation of the Relationship between the Incubation Time and Carotenoid Production in *Rhodotorula Slooffiae* and *R. Mucilaginosa* Isolated from Leather Tanning Wastewater. [Iran. J. Basic Med. Sci.](#) 16, 1114-1118.
- Otero, D.M., Bulsing, B.A., Huerta, K.M., Rosa, K.A., Zambiasi, R.C., Burkert, C.A. V., Burkert, J.F.M. 2019. Carotenoid-producing yeasts in the brazilian biodiversity: isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. *Braz. J. Chem. Eng.* 36, 117-129.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1031–1051.
- Reyna-Martínez, R., Gomez-Flores, R., López-Chuken, U.J., González-González, R., Fernández-Delgadillo, S., Balderas-Rentería, I., 2015. Lipid Production by Pure and Mixed Cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated in Nuevo Leon, Mexico. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 354-359.
- Ribeiro, J.E.S., Sant’Ana, A.M.S., Martini, M., Sorce, C., Andreucci, A., Melo, D.J.N., Silva, F.L.H., 2019. *Rhodotorula glutinis* cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 22, 1014-1019.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M., 2004. Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis. Harvest. Techn. Monog. Series 2, Washington, USA.
- Santos, R.C., Diogo, R.A., Fontana, J.D., Bonfim, T.M.B., 2016. Carotenoid production by *Halophilic archaea* under different culture conditions. *Curr. Microbiol.* 72, 641–651.
- Sun, Z. Zhou, Z-G.; Gerken, H.; Chen, F.; Liu, J., 2015. Screening and characterization of oleaginous *Chlorella* strains and exploration of photoautotrophic *Chlorella protothecoides* for oil production. *Bioresour. Technol.* 184, 53–62.

Villarreal, M.L.M.; Silva, A.J.B.; Canettieri, E.V.; Filho, I.H.J., Avaliação da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto com carvão ativado, In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável, 2004, Florianópolis. Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável e Ciclo de conferências sobre Política e Gestão Ambiental 2005, 2004, 4644-4653.

Xue, F.; Gao, B.; Zhu, Y.; Zhang, X.; Feng, W.; Tan, T., 2010. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresour. Technol.* 101, 15, 6092–6095.

Zhao, C.H., Chi, Z., Zang, F., Guo, F.J., Li, M., Song, W.B., Chi, Z.M., 2011. Direct conversion of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke into single cell oil by co-cultures of *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a and immobilized inulinase-producing yeast cells. *Bioresour. Technol.* 102, 6128-6133.

Zeni, J., Cence, K., Grando, C.E., Tiggermann, L., Colet, R., Lerin, L.A., Cansian, R.L., Toniazzi, G., Oliveira, D., Valduga, E., 2011. Screening of pectinase-producing microorganisms with polygalacturonase activity. Appl. Biochem. Biotechnol. 163, 383-392.

P_x = Cellular productivity

$Y_{X/S}$ = Substrate conversion into cells

$Y_{L/S}$ = Substrate conversion into lipid

$Y_{C/S}$ = Substrate carotenoid conversion

ARTIGO 2

Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate

Josevan da Silva^{*a}, Flávio Luiz Honorato da Silva^b, José Evangelista Santos Ribeiro^a, Débora Jamila Nóbrega de Melo^b, Felipe Augusto Santos^b, Lorena Lucena de Medeiros^a

^a Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil

^b Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil

*Corresponding author: josevanufpb@gmail.com

ABSTRACT: Carotenoids are pigments naturally present in plant and animal cells, which can also be chemically synthesized. Since they are fat-soluble pigments, they are usually found together with lipids. An alternative way of obtaining these compounds is through biotechnological production, in which agro-industrial residues can be used as substrates. The present study aimed to determine the variables that most influence the lipids and carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, using sisal bagasse hydrolyzate as substrate. Plackett-Burman design was carried out with eight input variables and three response variables. Yeast carotenoid production was mainly influenced by temperature and pH, with maximum biomass (12.87 g.L^{-1}) obtained at a temperature of $34.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and a pH of 5.0, and maximum carotenoid synthesis (1.13 g.L^{-1}) at a temperature of $22.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and a pH of 7.0. The results suggest that through the control of the cultivation conditions (pH and temperature), it is possible to use the sisal bagasse as substrate for the lipids and carotenoids production using the yeast *R. mucilaginosa*. The sisal bagasse has potential to obtain lipids and carotenoids on a large scale and at a reduced cost. In addition, the lipid profile obtained, rich in essential fatty acids, mainly oleic and linoleic, configure the biocompounds produced as high quality, with potential for application in the food, chemical, pharmaceutical and cosmetics sectors.

Keywords: waste; biomass; bioprocess; fatty acids.

1. Introduction

Carotenoids make up a group of pigments that are present mainly in vegetable raw materials and have biological properties, being used in various sectors of the industry (Mezzomo; Ferreira, 2016). In microorganisms, carotenoids are generally dissolved in lipids, being both bioconpounds accumulated during the stationary growth phase. There is a great demand for these bioconpounds due to their use as natural dyes in foods or as additives for food supplements, pharmaceuticals products and cosmetics (Yolmeh; Khomeiri, 2017).

In the biotechnological production of lipids and carotenoids, the use of agro-industrial waste as substrates is an alternative that allows adding value of the waste used, as well as reducing possible environmental impacts caused by its improper disposal. Compared with the chemical route, the biotechnological route has the advantage of obtaining natural compounds, which are considered more beneficial to the consumer's health, and which have greater commercialization potential (Besarab et al., 2018; Cipolatti et al., 2019).

The sisal bagasse is a residue originated from the processing of the *Agave sisalana* plant, which has high levels of cellulose and hemicellulose, containing about 90% of material that generates fermentable sugars (Debnath et al., 2010). Some microorganisms are capable of converting these sugars, when in excess, into biocompounds, such as oil yeasts of the genus *Rhodotorula*, which are capable of synthesizing and accumulatung large amounts of carotenoid pigments and lipids inside their cells (Beopoulos, Nicaud; Gaillardin, 2011).

The study of parameters involved in the cultivation of oleaginous yeasts is essential to ensure the viability of the biotechnological process, as these factors not only affect the growth of the microorganism, but also influence the accumulation and specificity of biocompounds. Thus, the present study aimed to check the influence of mineral and protein supplementation, temperature and pH of cultivation on biomass and carotenoids production by the yeast *R. mucilaginosa* grown in sisal bagasse hydrolyzate, using the Plackett-Burman experimental design methodology.

2. Material and methods

2.1 Raw material

The raw material used was sisal bagasse, a residue generated during the processing of sisal leaves to obtain fibers. The sisal bagasse used was obtained in the municipality of Cuité, PB, Latitude: 06° 29 '01" S, Longitude: 36° 09 '13 "W.

2.2 Thermogravimetric characterization of sisal bagasse

Thermogravimetric characterization of the sisal bagasse was carried out at the Activated Carbon Laboratory (Technology Center/UFPB), using a heating ramp of 10 °C min⁻¹, starting from ambient temperature (25 °C) up to 1000 °C. The analysis was carried out in a nitrogen atmosphere, at a flow rate of 25 mL.min⁻¹ and an initial sample mass of 10.4880 mg.

2.3 Sisal bagasse hydrolyzate obtention

For the hydrolysis of sisal bagasse, it was used a 1:10 (mass/volume) residue and sulfuric acid solution (5.5%) ratio. The hydrolysis was carried out in an autoclave under a pressure of 1 atm, at 121 °C, for 3 h. A filtration was performed at the end of the hydrolysis, with filtrate (hydrolyzate) being collected and the solid part being discarded.

2.4 Hydrolyzate treatment

The sisal bagasse hydrolyzate was subjected to an adsorption process in order to remove any inhibitors present. A concentration of 5% of active carbon was used, in the mass/volume proportion of the hydrolyzate (Villarreal, 2005).

2.5 Sugar profile determination

Sugars were determined by high performance liquid chromatography (VARIAN, Waters, California, USA). A chromatograph coupled to a refractive index detector (Varian 356 - LC), equipped with an isocratic solvent system, "Rheodyne" 20 µL valve; attached to an Agilent Hi-Plex H column (300 x 7.7 mm) was used. The samples were injected at a temperature of 65 °C, mobile phase composed of ultra pure water, flow rate of 0.6 mL.min⁻¹, injection of 20 µL of sample and analysis time of 60 min. The chromatograms of the samples were compared with the analyzed sugar standards and quantification was performed by the compound area on a calibration curve for each compound. Total sugars (cellobiose, glucose, xylose and arabinose) were evaluated.

2.6 Experimental design

In the experimental design, it was evaluated the effects of concentration of the culture medium components and initial pH over biomass and carotenoids production by the yeast *R. mucilaginosa*. Plackett-Burman experimental design was used, which is a fractional factorial whose main effects can be simply calculated as the difference between the average value of measurements taken at the lowest level (−1) and the average value of measurements at the highest level (+1) (Rodrigues; Iemma, 2012). The independent variables (input) were: monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4), magnesium sulfate heptahydrate (MgSO_4), yeast extract, initial pH of the medium, temperature, calcium chloride (CaCl_2), ammonium sulfate ($(\text{NH}_4) \text{SO}_4$) and sodium chloride (NaCl). Eight variables were studied in 12 trials with three central points (Table 1). The responses (dependent variables) during 96 h of study were: biomass (g.L^{-1}), specific production of carotenoids ($\mu\text{g.g}^{-1}$) and volumetric production of carotenoids (mg.L^{-1}).

Table 1 - Plackett-Burman experimental design with real and coded values

Assay	KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	MgSO ₄ (g.L ⁻¹)	YE* (g.L ⁻¹)	Initial pH	Temperature (°C)	CaCl ₂ (g.L ⁻¹)	(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	NaCl (g.L ⁻¹)
1	+1 (10.0)	-1 (0.2)	+1 (7.0)	-1 (5.0)	-1 (22.0)	-1 (0.0)	+1 (3.0)	+1 (0.5)
2	+1(10.0)	+1(0.8)	-1 (3.0)	+1 (7.0)	-1 (22.0)	-1 (0.0)	-1(1.0)	+1 (0.5)
3	-1 (6.0)	+1(0.8)	+1 (7.0)	-1 (5.0)	+1 (34)	-1 (0.0)	-1(1.0)	-1 (0.1)
4	+1(10.0)	-1 (0.2)	+1 (7.0)	+1 (7.0)	-1 (22.0)	+1 (0.2)	-1 (1.0)	-1 (0.1)
5	+1(10.0)	+1 (0.8)	-1 (3.0)	+1 (7.0)	+1 (34)	-1 (0.0)	+1 (3.0)	-1 (0.1)
6	+1(10.0)	+1(0.8)	+1 (7.0)	-1 (5.0)	+1 (34)	+1 (0.2)	-1 (1.0)	+1 (0.5)
7	-1(6.0)	+1(0.8)	+1 (7.0)	+1 (7.0)	-1 (22.0)	+1 (0.2)	+1 (3.0)	-1 (0.1)
8	-1(6.0)	-1(0.2)	+1 (7.0)	+1 (7.0)	+1 (34)	-1 (0.0)	+1 (3.0)	+1 (0.5)
9	-1(6.0)	-1(0.2)	-1 (3.0)	+1 (7.0)	+1 (34)	+1 (0.2)	-1 (1.0)	+1 (0.5)
10	+1(10.0)	-1(0.2)	-1 (3.0)	-1 (5.0)	+1 (34)	+1 (0.2)	+1 (3.0)	-1 (0.1)
11	-1(6.0)	+1(0.8)	-1 (3.0)	-1 (5.0)	-1 (22.0)	+1 (0.2)	+1 (3.0)	+1 (0.5)
12	-1(6.0)	-1(0.2)	-1 (3.0)	-1 (5.0)	-1 (22.0)	-1 (0.0)	-1 (1.0)	-1 (0.1)
13	0 (8.0)	0 (0.5)	0 (5.0)	0 (6.0)	0 (28)	0 (0.1)	0 (2.0)	0 (0.3)
14	0(8.0)	0 (0.5)	0 (5.0)	0 (6.0)	0 (28)	0 (0.1)	0 (2.0)	0 (0.3)
15	0(8.0)	0 (0.5)	0 (5.0)	0 (6.0)	0 (28)	0 (0.1)	0 (2.0)	0 (0.3)

*Yeast extract

2.7 Microorganism

R. mucilaginosa yeast CCT 3892 (in its activated form) was acquired from the André Tosello Foundation, Collection of Tropical Cultures of São Paulo. For growth and maintenance, the colonies were incubated in Petri dishes with YMA medium (Yeast, Malt, Agar), composed of 10 g.L⁻¹ of glucose, 3 g.L⁻¹ of yeast extract, 3 g.L⁻¹ of malt extract, 5 g.L⁻¹ of peptone bact and 20 g.L⁻¹ of agar. The Petri dishes were incubated at 30 °C for growth and further refrigerated, at a temperature of 4 °C.

2.8 Pre-inoculum

The Petri dish containing the yeast *R. mucilaginosa* was scraped by adding 5 ml of sterile distilled water until the formation of a cell suspension. The 5 mL were transferred to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 200 mL of the medium used for the synthetic culture

(Yeast Malt medium). After the inoculum, the Erlenmeyer flask was set into “Shaker” incubator at 30 °C and 200 rpm.

2.9 Growth

The medium was centrifuged 24 h after the beginning of the pre-inoculum step with the supernatant being discarded. After, 50 mL of sterile distilled water were added and the cell concentration was determined in a Neubauer chamber in order to calculate the inoculum volume corresponding to 1×10^7 total cells mL^{-1} . This cells volume was inoculated in 300 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL the sisal bagasse hydrolyzate. The Erlenmeyer flasks were incubated in a “Shaker” at 30 °C and 200 rpm for 96 h, with cultivation carried out in triplicate.

2.10 Analytical methods

2.10.1 Biomass

At intervals of 48 and 96 h, 2 mL aliquots of the sample were collected, diluted in distilled water and read in a spectrophotometer (Biospectro SP 220). The biomass was quantified by measuring the turbidity of the diluted sample by spectrophotometry at 600 nm, with the aid of an absorbance versus concentration of dry cells standard curve (Aksu; Eren, 2007).

2.10.2 Determination of total carotenoids

The measurement of total carotenoids was performed 96 h after inoculum, being this time the one with highest biomass production. A 5 mL aliquot of the supernatant was collected and centrifuged, the supernatant discarded and the biomass used to quantify the total carotenoids by spectrophotometry at 450 nm (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004).

2.10.3 Extraction, quantification and fatty acid profile of lipids

The extraction of total lipids was performed using the method of Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959), modified by Manirakiza et al. (2001). The extracted oil was transesterified according to the IUPAC 2.301 standard method (IUPAC, 1987).

The chromatographic profiles were recorded, and the percentage of compounds was determined through a calibration curve using a gas chromatograph (GC) coupled to a mass detector (Shimadzu® GCMS-QP2010, Kyoto, Japan) equipped with a Durabound DB- 23 capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm column). The injector and detector temperatures were adjusted to 230 °C, and the column temperature was 90 °C. The elution gradient in the

column followed three different ramps: 90 to 150 °C (10 °C.min⁻¹), 150 to 200 °C (5 °C.min⁻¹) and 200 to 230 °C (3 °C.min⁻¹) and helium was used as carrier gas.

3. Results and discussion

3.1 Thermogravimetric characterization of sisal bagasse

The high content of lignocellulosic compounds (lignin, hemicellulose and cellulose), according to Table 2, configure sisal bagasse as a substrate with a strong potential for generation of fermentable sugars, which can be converted into carotenoids inside the *R. mucilaginosa* cells (Debnath et al., 2010).

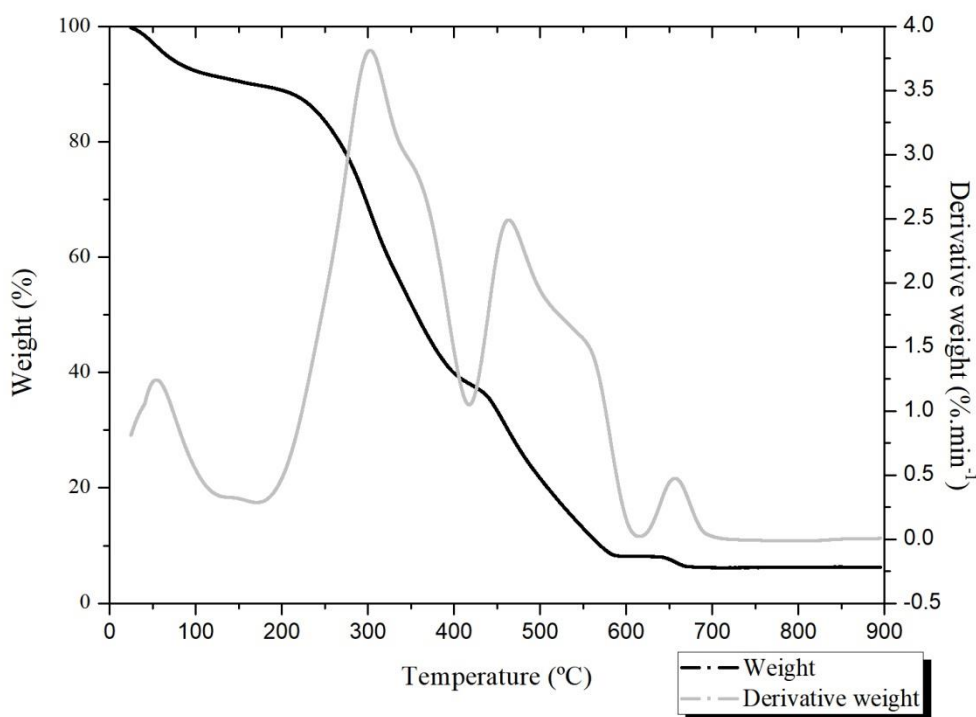


Figure 1 - Thermogravimetric characterization of sisal bagasse (TG) and its derived curve (DTG).

The high amount of fixed mineral residue (ash) is also worth mentioning, since ash is practically composed of minerals, which are essential in the yeast development process and in the synthesis of carotenoids (Cheng and Yang, 2016). The results for the thermogravimetric characterization were consistent when compared to those found by Lima et al. (2013), mainly the hemicellulose content, which was 20.6%.

Table 2 - Thermogravimetric characterization of sisal bagasse

Component	Percentage (%)
Moisture	4.88
Lignin	28.80
Hemicellulose	20.01
Cellulose	31.98
Ash	6.27

3.2 Reducing sugars profile

The hydrolysis of the sisal bagasse released sugars that can be metabolized by oleaginous yeasts for the production of lipids and carotenoids. The breakdown of the polymers present in the bagasse originated glucose, xylose and arabinose (Table 3).

Table 3 - Sugar profile of sisal bagasse hydrolyzate

Component	Concentration (g.L ⁻¹)
Glucose	2.62
Xylose	11.92
Arabinose	3.70
Total	18.24

The liberation of pentoses (xylose and arabinose) and hexoses (glucose) during sisal hydrolysis is extremely important for the development of a biotechnological process (Medeiros et al., 2018), since these carbohydrates are used as a carbon source for both cell growth and synthesis of biocompounds inside the cells of microorganisms.

3.3 Plackett-Burman Design

The actual levels and responses of the Plackett-Burman experimental design are shown in Table 4.

Table 4 –Plackett-Burman with actual values and responses for biomass, specific carotenoids production (SCP) and volumetric carotenoids production (VCP), in 96 h.

Assay	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	*Y ₁	**Y ₂	***Y ₃
1	10	0.2	7.0	5.0	22	0.0	3.0	0.5	8.42	72.85	0.61
2	10	0.8	3.0	7.0	22	0.0	1.0	0.5	10.07	88.96	0.90
3	6.0	0.8	7.0	5.0	34	0.0	1.0	0.1	9.76	32.5	0.32
4	10	0.2	7.0	7.0	22	0.2	1.0	0.1	12.17	92.44	1.13
5	10	0.8	3.0	7.0	34	0.0	3.0	0.1	4.72	9.80	0.05
6	10	0.8	7.0	5.0	34	0.2	1.0	0.5	12.87	26.27	0.34
7	6.0	0.8	7.0	7.0	22	0.2	3.0	0.1	4.69	179.66	0.84
8	6.0	0.2	7.0	7.0	34	0.0	3.0	0.5	9.39	8.38	0.08
9	6.0	0.2	3.0	7.0	34	0.2	1.0	0.5	7.78	15.18	0.12
10	10.0	0.2	3.0	5.0	34	0.2	3.0	0.1	8.44	50.47	0.43
11	6.0	0.8	3.0	5.0	24.0	0.2	3.0	0.5	7.18	74.46	0.53
12	6.0	0.2	3.0	5.0	24.0	0.0	1.0	0.1	6.01	101.29	0.61
13	8.0	0.5	5.0	6.0	28.0	0.1	2.0	0.3	10.61	42.76	0.45
14	8.0	0.5	5.0	6.0	28.0	0.1	2.0	0.3	10.61	46.47	0.49
15	8.0	0.5	5.0	6.0	28.0	0.1	2.0	0.3	10.88	46.17	0.49

X₁ - KH₂PO₄ (g.L⁻¹); X₂ - MgSO₄ (g.L⁻¹); X₃ - Yeast extract (g.L⁻¹); X₄ - initial pH; X₅ - Temperature (°C); X₆ - CaCl₂; X₇ - (NH₄)SO₄ (g.L⁻¹); X₈ - NaCl (g.L⁻¹); Y₁ - Biomass (g.L⁻¹); Y₂ - SCP (µg.g⁻¹); Y₃ - VCP (g.L⁻¹).

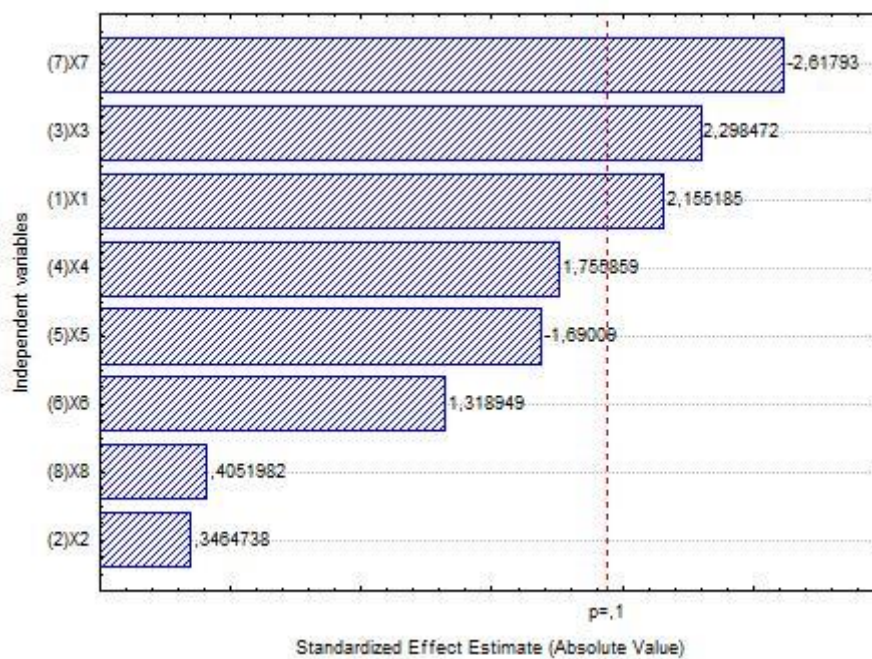
The highest biomass (12.87 g.L⁻¹) was obtained when the yeast was grown at 34 °C and the highest volumetric production of carotenoids (1.13 g.L⁻¹), at 22 °C (Assay 4, Table 4). Even with a high biomass, the volumetric production of carotenoids obtained at 34 °C was considerably low (0.34 g.L⁻¹), showing that, sometimes, a lower biomass yield can be more advantageous when the goal is producing of carotenoids.

The increase in the concentration of ammonium sulfate disfavored the growth of yeast, while the increase in the concentration of potassium phosphate and yeast extract led to best results. Temperature was the factor that influenced both specific production and volumetric production, even though it did not significantly influence the biomass produced. The pH, although it did not have a considerable influence on the biomass produced, was essential for the synthesis of carotenoid pigments inside the yeast cells. The reduction of the pH from 7.0 to 5.0 favored the synthesis of these pigments (Figure 2 B).

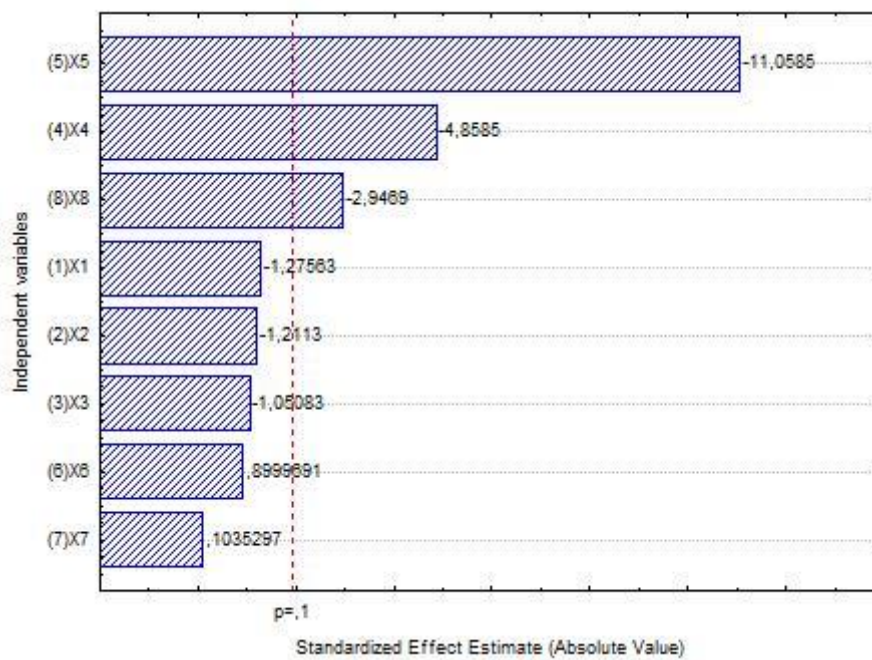
It was possible to observe a reduction in the production of carotenoids with an increase in temperature, pH, concentration of NaCl and ammonium sulfate, and a rise with an increase in the concentration of potassium phosphate in the investigated range. These significant effects can be seen more clearly in Figure 2 (Pareto chart) with the effects of the represented variables.

The addition of potassium phosphate and magnesium sulfate had a positive association with the growth of *R. mucilaginosa* in the sisal bagasse hydrolyzate (Figure 2-A), showing that some ions and salts act as stimulants, as reported by Cheng and Yang (2016), where supplementation with metal ions increased the biomass produced.

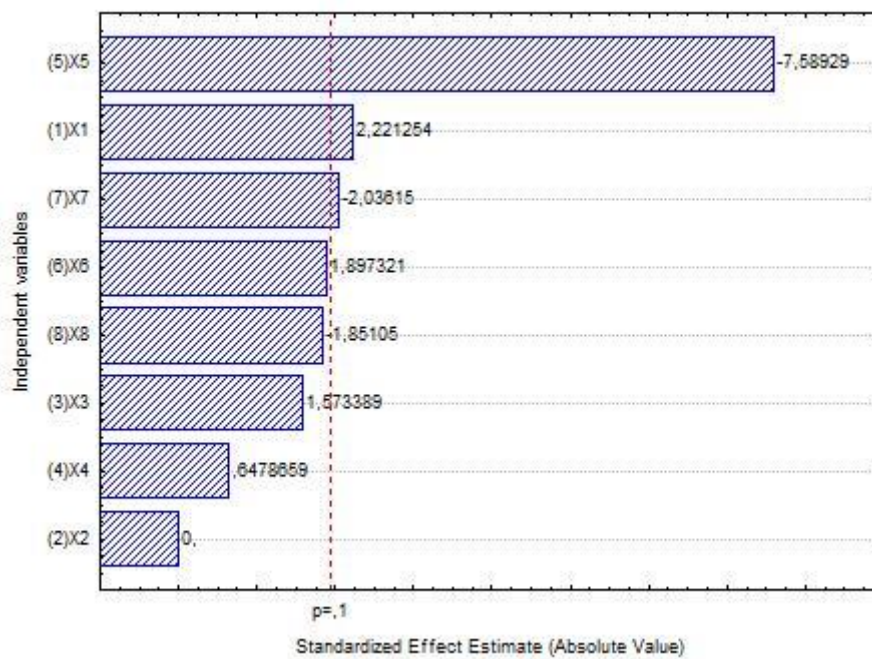
Figure 2 - Effects of independent variables on the biomass produced (Figure 2-A), specific production in carotenoids (Figure 2-B), and volumetric production of carotenoids (Figure 2-C) at a level of 90%.



A



B



C

In this study, the use of ammonium sulfate had a negative effect on the biomass produced (Figure 2-A), which is in agreement with Dhaliwal and Chandra (2018), who report that the nitrogen source affects the concentration of carotenoids, the biomass produced and the volumetric production of carotenoids by *R. mucilaginos*a. As the synthesis of carotenoids is favored by the limitation of a nutrient (usually nitrogen), the increase in the levels of

ammonium sulfate may have hindered this limitation, consequently favoring the synthesis of pigments.

The specific production of carotenoids (SCP) was mainly influenced by temperature, initial pH and sodium chloride concentration (Figure 2-B), and the increase in levels disadvantaged the accumulation of pigments inside the yeast cells. Temperatures between 20 and 30 °C are suitable for yeast growth, however, below 20 °C growth is inhibited, and above 30 °C the synthesis of carotenoids is reduced, with 22 °C being the ideal temperature for maximum growth of *R. mucilaginosa* (Cheng and Yang, 2016).

Regarding the volumetric production of carotenoids, temperature was also a factor that had a great influence, as well as in specific production, the increase in the level disfavored production (Figure 2-C), as reported by Valduga et al. (2009). The increase in potassium phosphate concentrations proved to be positive, which can be justified because minerals are essential for the synthesis of pigments inside the cells of microorganisms, although some authors report that some metal ions (Zn^{2+} and Mn^{2+}) have an inhibitory effect on the production of torulene and torularrodine, interfering with the metabolism of enzymes involved in carotogenesis (Buzzini et al., 2005).

The pH of the medium is one of the most important factors for the biotechnological production of carotenoids and its control is of fundamental importance, both for the growth of yeast and for the accumulation of pigment inside the cell. In the study by Machado et al. (2019), the initial pH had a significant positive effect on the volumetric production of carotenoids by *R. mucilaginosa*, with the maximum production at a pH of 6. In contrast, the concentrations of peptone, yeast extract, malt extract and glucose had a negative effect.

In this study, the pH variation did not have a significant influence on the production of biomass by *R. mucilaginosa* when grown in the sisal bagasse hydrolyzate (Figure 2-A). According to Cheng and Yang (2016), a pH variation between 5 and 7 does not significantly influence the growth of *R. mucilaginosa*, and at an initial pH of 4, there is a considerable reduction in the biomass produced. On the other hand, at this pH the concentration of carotenoids is high, which means that at a low pH, yeast cells are forced to synthesize carotenoids. The drawback would be that the volume production of carotenoids is reduced due to the lower biomass at this pH.

In the best cultivation condition, 12.87 g.L⁻¹ of biomass were produced, a result that is approximately twice of that reported by Reyna-Martinez et al. (2015), who obtained 6.27 g.L⁻¹ when they cultivated *R. mucilaginosa* yeast in synthetic medium based on glucose, yeast extract and peptone. The maximum biomass in the present study was also much higher than

that obtained by Marova et al. (2012), which produced 7.70 g.L^{-1} of dry biomass of *R. mucilaginosa* using a medium based on potato extract.

The specific production of carotenoids ($92.44 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$), in the best condition, was very similar to that of Lopes et al. (2017) obtained in one of their study conditions ($93.2 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$), in which the authors investigated the influence of different methods of cell disruption in the extraction of carotenoids. Volumetric production (1.13 mg.L^{-1}) was higher than the maximum obtained by Ribeiro et al. (2019), when they cultivated the yeast *Rodothorula glutinis* in manipueira (0.98 g.L^{-1}), and equivalent to more than three times of that obtained by Naghavi et al. (2013), which produced 0.29 mg.L^{-1} using *R. mucilaginosa* and a synthetic medium.

The highest production of carotenoids was obtained using the minimum value of the main source of nitrogen (ammonium sulfate). This can be justified by taking into account that the carbon/nitrogen ratio (C/N) is one of the factors that most influence the accumulation of lipids by microorganisms, since the synthesis starts when a nutrient is exhausted (usually nitrogen), with another in excess (usually carbon), which is converted into biocompounds. When the ammonium sulfate was reduced, the C/N ratio was high, favoring the synthesis of carotenoids inside the yeast cells, since the limitation of a nutrient in the medium can lead to the stress of the microorganism, favoring the accumulation (Petti et al., 2011).

Carotenoids from oleaginous microorganisms have potential for application in various sectors of the industry and can be used as dyes, in the composition of supplements, in pharmaceutical products, in cosmetics, as natural antioxidants in foods, among other applications. The search for these natural pigments has been intense in recent years and some studies have already carried out some tests on the application of these biocompounds in food, as reported by Elsanhoty et al. (2017), in which carotenoids extracted from *R. mucilaginosa* were used as a dye in the production of sweet jelly.

Even though is was used a residue (sisal bagasse) as a substrate, the volumetric production of carotenoids in the present study (1.13 mg.L^{-1}) was much higher than that obtained in the studies by Naghavi et al. (2013) who used a synthetic medium and obtained 0.29 mg.L^{-1} of carotenoids cultivating *R. mucilaginosa*. The maximum biomass (12.87 g.L^{-1}) produced was approximately three times greater than that found in the optimal condition of the study by Dhaliwal and Chandra (2018), who obtained 4.6 g.L^{-1} of dry biomass in a medium containing glucose, glycerol, peptone, H_2O_2 and pH 6.5. It was also about twice the maximum biomass of the study by Reyna-Martínez et al. (2015), which produced 6.27 g.L^{-1} .

3.2 Lipids and fatty acid profile

In the oil extracted from the yeast grown in the sisal hydrolyzate, fatty acids with more than 15 carbon atoms were detected, most of them unsaturated (Table 5).

Table 5 - Fatty acid profile of *R. mucilaginosa* biomass oil cultivated in sisal hydrolyzate

Fat acid	%
Palmitic acid (C16:0)	11.79
Stearic acid (C18:0)	4.20
Oleic acid (C18:1n9c)	50.54
Linoleic acid (C18:2n6c)	29.58
Alpha-linolenic acid (C18:3n3)	3.89

Each liter of substrate (sisal bagasse hydrolyzate) was produced 0.54 g of lipids. The fatty acid profile of the extracted oil (Table 5) was very similar to that from oilseeds, with unsaturated and long-chain fatty acids prevailing, which is in accordance with Papanikolau and Aggelis (2011). Oilseed yeasts are capable of producing lipids with fatty acid profiles similar to those of vegetable oils, with the presence of some saturated and monounsaturated fatty acids, but predominantly those containing 16 to 18 carbon atoms.

Short-chain fatty acids were not detected, since the lowest chain was palmitic acid (C16: 0). The predominant fatty acids were oleic acid (C18: 1n9c), equivalent to approximately half of the total fatty acids, followed by linoleic acid (C18: 2n6c). In the study by Gientka et al. (2017), oleic acid was predominant (36.6%), followed by linolenic acid. The presence of this fatty acid, belonging to the omega family, deserves mention, since fatty acids of this family have nutritional and medicinal properties.

Oleic acid was also the main fatty acid obtained when vinasse and crude glycerol were used for the production of lipids by *R. glutinis* (Yen; Yang; Yu, 2012). However, it is important to note that the change in the carbon source can alter the fatty acid profile of the oil produced, as in the study by Easterling et al. (2009), in which the use of glycerol increased the production of linoleic acid, when compared to the use of dextrose.

4. Conclusion

The production of carotenoids by *R. mucilaginosa* was mainly influenced by temperature and pH. The results suggest that through the control of the cultivation conditions

(pH and temperature) it becomes possible to use the sisal bagasse as a substrate for the production of lipids and carotenoids using *R. mucilaginosa*. The biocompounds and the fatty acid profile obtained configure the sisal bagasse as a potential substrate for obtaining these bioproducts, with reduced cost (since it is a residue), aiming at the application in several sectors of the industry, such as food, pharmaceutical, chemical and cosmetics.

Aknowledgments

Authors are thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for supporting this research and to André Tosello Foundation for donating the *R. mucilaginosa* strain used in this work.

Referências

- Aksu, Z., Eren, A.T., 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochem. Engin. J.* 35, 107-113.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.M., Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10, 1193-1203.
- Besarab, N.V., Gerasimovic, K.M., Kanterova, A.V., Novik, G.I., 2018. Biosynthetic production of carotenoids using yeast strains of genus *Rhodotorula* on the cheap beer wort substrate. *Journal of microbiology biotechnology and food sciences*, 4, 383-386.
- Bligh, E.G., Dyer, J.W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Buzzini, P., Martini, A., Gaetani, M., Turchetti, B., Pagnoni, U.M, Davoli, P., 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Enz. Microb. Technol.* 36, 687–692.

- Cheng, Y.T., Yang, C.F., 2016. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 61, 270-275.
- Cipolatti, E.P., Remedi, R.D., Sá, C.S., Rodrigues, A.B., Ramos, J.M.G., Burkert, C.A.V., Furlong, E.B., Burkert, J.F.M., 2019. Use of agroindustrial byproducts as substrate for production of carotenoids with antioxidant potential by wild yeasts. *Biocatal. and Agricult. Biotechnol.* 20, 1014-1019.
- Debnath, M., Pandey, M., Sharma, R., Thakur, G.S., Lal, P., 2010. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. *J. Med. Plant. Res.* 43, 177–187.
- Dhaliwal, K., and Chandra, N., 2015. Optimization of Carotenoids Production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Int J Pharm Sci Res.* 6, 1161-1165.
- Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M., 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*, *Bioresour. Technol.* 100, 356-361.
- Elsanhoty, R.M., Al-Turki, A.I., El-Razik, M.M.A. 2017. Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. *J. Food Agric. Environ.* 15, 21-26.
- Gientka, I., Gadaszewska, M., Błazejak, S., Kieliszek, M., Bzducha-Wrobel, A., Stasiak-Rozanska, L., Kot, A.M., 2017. Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in médium with glycerol. *Europ. Food Res. and Technol.* 243, 275-286.
- IUPAC, 1987. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standart Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 6th International Union of Pure and Applied

- Chemistry, 6th Edition (Method II.D. 19) Pergamon Press, Oxford, Part I (Sections 1 and 22), 96-102.
- Lima, C.S.S., Conceição, M.M., Silva, F.L.H., Lima, E.E., Conrado, L.S., Leão, D.A.S., 2013. Characterization of acid hydrolysis of sisal. *App. Energ.*, 102, 254–259.
- Lopes, N.A., Remedi, R.D., Sá, C.S., Burkert, C.A.V., Burkert, J.F.M., 2017. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Sci. biotechnol.* 26, 759-766.
- Machado, W.R.C., Silva, L.G., Vanzela, E.S.L., Del Bianchi, V.L., 2019. Evaluation of the process conditions for the production of microbial carotenoids by the recently isolated *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. *Brazilian Journal of Food Technology.* 22, 1-14.
- Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P., 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journ. of Food Compos. and Anal.* 14, 93-100.
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., Haronikova, A., 2012. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journ. of environ. Managem.* 95, 5338-5342.
- Medeiros, L.L, Da Silva, F.L.H., Da Conceição, M.M., Conrado, L.S., Madruga, M.S., da Costa, W.A., Bezerra, T.K.A. 2018. Efficient hydrolysis of cellulosic biomass into free sugars for a future development processing a biorefinery contexto. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16, 448–452.
- Mezzomo, N., Ferreira, S.R.S., 2016. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *Journal of Chem.*,16, 1-16, 2016.
- Naghavi, F.S., Hanachi, P., Soudi, M.R., Saboora, A., Ghorbani, A., 2013. Evaluation of the Relationship between the Incubation Time and Carotenoid Production in *Rhodotorula*

- Slooffiae* and *R. mucilaginosa* Isolated from Leather Tanning Wastewater. [Iran. Journ. Basic. Med. Sci.](#) 16, 1114-1118
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Europ. Jour. of Lipid Scienc. Technol.* 113, 1031–1051.
- Petti, A.A., Crutchfield, C.A., Rabinowitz, J.D., Botstein, D., 2011. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1089–1098.
- Reyna-martínez, R., Gomez-Flores, R., López-Chuken, U. J., González-González, R., Fernández-Delgadillo, S., Balderas-rentería, 2015. I. Lipid Production by Pure and Mixed Cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated in Nuevo Leon, Mexico. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 354-359.
- Ribeiro, J.E.S., Sant’Ana, A.M.S., Martini, M., Sorce, C., Andreucci, A., Melo, D.J.N., Silva, F.L.H., 2019. *Rhodotorula glutinis* cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 22, 1014-1019.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura, M., 2004. Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis. Harvest. Techn. Monog. Series 2, Washington, USA.
- Rodrigues M.I., Iemma A.F. 2012. Understanding factorial design. In: Experimental design and process optimization, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1, 93–122.
- Silva, J., Silva, F. L. H., Santos, S. F. M., Ribeiro, J. E. S., Medeiros, L. L., Ferreira, A. L. O. 2018. Produção de biomassa e lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. *Braz. J. Food Technol.* 21, 1-6.
- Valduga, E., Valério, A., Treichel, H., Júnior, A. F., Di Luccio, Marco, Food Bioprocess Technol (2009) 2: 415.
- Villarreal, M.L.M.; Silva, A.J.B.; Canettieri, E.V.; Filho, I.H.J., Avaliação da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto com carvão ativado, In: Congresso

- Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável, 2004, Florianópolis. Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável e Ciclo de conferências sobre Política e Gestão Ambiental 2005, 2004, 4644-4653.
- Yen, H.W., Yang, Y.C., Yu, Y.H., 2012. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. J. Biosci. Bioengin. 114, 453-456.
- Yolmeh, M., Khomeiri, M., 2017. Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. Biocatal. Agric. Biotechnol. 10, 285-290.

6 CONCLUSÕES

A temperatura e o pH foram as variáveis que mais influenciam na produção de biomassa e carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo a biomassa máxima obtida em temperatura de 34,0 °C e pH de 5,0, e a síntese de carotenoides máxima em temperatura de 22,0 °C e pH de 7,0.

A fibra e o bagaço do sisal apresentaram composição química que favorece o cultivo do microrganismo, com destaque para elevados índices de açúcares e minerais.

A levedura foi capaz de crescer e acumular bioprodutos apenas com a fonte de carbono presente no resíduo (bagaço), sem a necessidade de suplementação oriunda de uma fonte sintética (glicose), ponto importante com relação ao custo do processo.

A conversão de um resíduo agroindustrial, por meio de uma levedura oleaginosa, em pigmentos, mostrou-se viável devido aos resultados de biomassa, lipídios e carotenoides produzidos, uma vez que esses biocompostos possuem aplicações na indústria alimentícia.

Todavia, sugerem-se novos estudos na área, visando à ampliação de escala do processo e melhorias nas técnicas de extração dos metabólitos, assim como também para determinar os métodos de aplicação dos mesmos em matrizes alimentícias.

APÊNDICES

APÊNDICE I

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2018 015147 9**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 24098477000110**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Cidade Universitária**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58059-900**País:** Brasil**Telefone:** (83) 32167558**Fax:****Email:** inova@reitoria.ufpb.br

APÊNDICE I

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES UTILIZANDO LEVEDURAS DO GÊNERO RHODOTORULA E O HIDROLISADO DO SISAL COMO SUBSTRATO

Resumo: A presente invenção refere-se ao processo de produção de carotenoides utilizando leveduras do gênero Rhodotorula e o hidrolisado do sisal. Os carotenoides são obtidos a partir do cultivo de leveduras oleaginosas nos hidrolisados da fibra e do bagaço do sisal, seguido do rompimento celular e da extração, com potencial para aplicação em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos.

Ativar o Windows
Acesse Configurações