



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

CARLOS AUGUSTO DA SILVA SANTANA

TESE DE DOUTORADO

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM BIORREATOR
UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

João Pessoa - PB

2022

CARLOS AUGUSTO DA SILVA SANTANA

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM BIORREATOR UTILIZANDO
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL**

João Pessoa - PB

2022

CARLOS AUGUSTO DA SILVA SANTANA

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM BIORREATOR UTILIZANDO
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL**

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

Coorientadora: Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

João Pessoa - PB

2022

S232p Santana, Carlos Augusto da Silva.

Produção de compostos bioativos em biorreator
utilizando resíduo agroindustrial / Carlos Augusto da
Silva Santana. - João Pessoa, 2022.

81 f. : il.

Orientação: Flávio Luiz Honorato da Silva.

Coorientação: Andrea Lopes de Oliveira Ferreira.

Tese (Doutorado) - UFPB/de Tecnologia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Carotenoides. 3.
Biorreator. 4. Biotecnologia. I. Silva, Flávio Luiz
Honorato da. II. Ferreira, Andrea Lopes de Oliveira.
III. Título.

UFPB/BC

CDU 664(043)

CARLOS AUGUSTO DA SILVA SANTANA

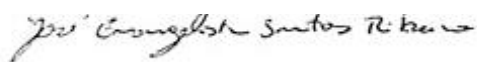
**AMPLIAÇÃO DE ESCALA DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS
UTILIANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL
BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
DEQ/CT/UFPB
Orientador



Prof.ª Dr.ª. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira
DEQ/CT/UFPB
Coorientadora



Prof. Dr. José Evangelista Santos Ribeiro
DEA/CT/UFPB
Examinador externo



Prof. Dr. Josevan da Silva
DEA/CT/UFPB
Examinador externo



Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva
(Membro Externo/UFPB)



Prof. Dr. Luciano Fernandes. Monteiro
UFS - Departamento de Engenharia de Produção (DEPRO)
Examinador externo

À minha família, principalmente aos meus pais Antônio Carlos Santana e Maria José Ribeiro da Silva, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe, Maria José Ribeiro da Silva e o meu pai Antonio Carlos Santana por todo apoio, compreensão, amor e atenção nas horas em que mais precisei podendo contar sempre com sua amizade, amor e cuidado;

Agradeço também aos meus orientadores, o professor Flávio Luiz Honorato da Silva que mesmo sem me conhecer direito, aceitou me orientar e dividiu comigo o seu companheirismo, sua paciência, sua amizade e estive comigo esses quatro anos sempre com muita atenção e cuidado, a professora Andrea Ferreira e o professor Giovanilton de Oliveira por terem me dado essa chance de trabalharmos juntos nesse doutorado, por terem confiado em mim mais uma vez e por ter me dado todo apoio que precisei, não mediram esforços para me ajudar, que Deus possa recompensá-los;

Aos meus Amigos que fiz durante esses quatro anos na UFPB: Josevan, José Evangelista, Valdenice, Renata, Tatiana, Debora, Rian, Lorena, Leanderson, Bruno, sem me esquecer da Fernanda (secretária do PPGCTA) e da sua simpatia;

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia/DEQ/UFPB;

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação e defesa, Professora Dr^a Elizama Aguiar, Professor Dr José Evangelista, Professora Dr^a Lorena Lucena, Professor Dr Luciano Monteiro e o Professor Dr Josevan da Silva.

A professora Dr^a Rita de Cassia Queiroga (*in memoriam*) que no início do meu doutorado me ajudou e me deu muita força para que eu pudesse estudar.

A minha amiga Ana Flávia que juntos formamos a dupla Pink e Cérebro, fizemos o mestrado juntos na UFBA e agora encontra-se mais perto de Deus.

Aos meus amigos da turma do doutorado e os professores do programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos que passamos por tantos momentos juntos durante as aulas.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por ter me dado a oportunidade de realizar o meu doutoramento e me desenvolver não só como aluno e cientista, mas também como pessoa e como ser humano.

O início da sabedoria é a admissão da
própria ignorância.

Sócrates

RESUMO

Os nutracêuticos são moléculas bioativas que podem ser utilizadas para suprir as necessidades nutricionais do organismo, ao passo que auxiliam na saúde como um todo. Muitos esforços têm sido empregados com objetivo de desenvolver tecnologias que otimizem a produção destas biomoléculas por microrganismos, e neste sentido, várias metodologias são inteligentemente empregadas como é o caso do uso dos biorreatores integrados. Atualmente, têm-se concedido especial atenção aos processos biotecnológicos como alternativa às rotas químicas devido aos baixos custos de produção. O uso de resíduos é bastante conveniente tanto do ponto de vista da sustentabilidade quanto econômico quando são utilizados como substrato para o desenvolvimento de microrganismos e, conseqüentemente, na produção de um composto de alto valor agregado como exemplo as biomoléculas. O trabalho teve por objetivo estudar a produção de carotenoides, lipídeos e biomassa em Biorreator integrado utilizando as leveduras *Rhodothorula glutinis* e *Paffia rhodozyma* como agentes produtores e avaliar a viabilidade do uso da manipueira, como substrato para essa produção. Foram feitas análises da biomassa, lipídeos e carotenoides produzidos. As análises físico-químicas da manipueira foram realizadas e foram encontrados 93,54% de umidade, 32,24 g/L de açúcares redutores, 47,18 g/L de açúcares totais, 1,58% de proteínas, 1% de cinzas, 7,3 °Brix de sólidos solúveis totais e pH de 5,3. Os melhores resultados encontrados durante os cultivos individuais das leveduras em biorreator: 8,57 g/L e 9,85 g/L de biomassa, 0,81 g/L e 4,19 g/L de lipídeos e 1,3 mg/L e 1,1 mg/L de carotenoides totais para *R. glutinis* e *P. rhodozyma*, respectivamente. Ao passo que durante o cultivo misto foram produzidos 7,15 g/L de biomassa e as maiores quantidades de lipídeos (6,04 g/L) e de carotenoides totais (1,51mg/L) quando comparados com os cultivos individuais. Os microrganismos utilizados neste estudo apresentaram crescimento importante quando cultivados em biorreator em meio contendo manipueira como fonte de carbono e, portanto, estes resultados apoiam a viabilidade da utilização da manipueira como substrato a ser utilizado em um processo biotecnológico com o objetivo de produção de carotenoides e lipídeos e biomassa microbiana.

Palavras chave: Carotenoides; Biorreator; Biotecnologia.

ABSTRACT

Nutraceuticals are bioactive molecules that can be used to meet the nutritional needs of the body, while helping with health as a whole. Many efforts have been used to develop technologies that optimize the production of these biomolecules by microorganisms, and in this sense, several methodologies are intelligently employed, such as the use of integrated bioreactors. Currently, special attention has been given to biotechnological processes as an alternative to chemical routes due to low production costs. The use of residues is quite convenient both from the point of view of sustainability and economics when they are used as a substrate for the development of microorganisms and, consequently, in the production of a compound of high added value such as biomolecules. The objective of this work was to study the production of carotenoids, lipids and biomass in an integrated Bioreactor using the yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Paffia rhodozyma* as producing agents and to evaluate the feasibility of using cassava as a substrate for this production. Biomass, lipids and carotenoids produced were analyzed. The physicochemical analyzes of the manipueira were carried out and found 93.54% of moisture, 32.24 g/L of reducing sugars, 47.18 g/L of total sugars, 1.58% of proteins, 1% of ash, 7.3 °Brix of total soluble solids and pH of 5.3. The best results found during individual yeast cultures in bioreactor: 8.57 g/L and 9.85 g/L of biomass, 0.81 g/L and 4.19 g/L of lipids and 1.3 mg/L and 1.1 mg/L of total carotenoids for *R. glutinis* and *P. rhodozyma*, respectively. Whereas during the mixed culture, 7.15 g/L of biomass and the highest amounts of lipids (6.04 g/L) and total carotenoids (1.51 mg/L) were produced when compared to the individual cultures. The microorganisms used in this study showed significant growth when cultivated in a bioreactor in a medium containing manipueira as a carbon source and, therefore, these results support the feasibility of using manipueira as a substrate to be used in a biotechnological process with the objective of producing carotenoids and lipids and microbial biomass.

Keywords: Carotenoids; Bioreactor; Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de publicações nos últimos dez anos para o termo agroindustrial waste...	25
Figura 2. Estrutura molecular dos carotenoides	28
Figura 3. Estimativa de participação de carotenoides no mercado mundial em 2021	29
Figura 4. Produção, coleta e envase da manipueira.....	37
Figura 5. Preparo do inóculo em meio YM.....	41
Figura 6. Biorreator utilizado nos ensaios de produção de carotenoides.	42
Figura 7. Cultivo misto com os microrganismos <i>Rhodotorula glutinis</i> e <i>Paffia rhodozyma</i> após cultivo em biorreator, com aumento de 100×.....	45

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figure 1: Growth curve for <i>R. glutinis</i> in the described bioreactor over 84 hours. Bars represent the deviation for triplicates.....	62
Figure 2: Values of reducing sugar over 84 hours of cultivation.....	63
Figure 3: Production of carotenoids by <i>R. glutinis</i> over 84 hours of cultivation.....	64

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure 1: Biomass concentration throughout the process of single and mixed culture.....	77
Figure 2: Values of reducing sugars throughout the fermentation process (84 h)	81
Figure 3: Production of carotenoids by mixed culture of <i>Rhodotorula glutinis</i> and <i>Paffia rhodozyma</i> throughout the cultivation period. Data are expressed as duplicate means and standard deviation.....	82

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1: Composition of cassava wastewater used in this work.....	61
Table 2: Composition of fatty acids produced during each fermentation.....	66
Table 3: Productivity of experiments in bioreactor using cassava water as a carbon source..	66

ARTIGO 2

Table 1: Composition of cassava wastewater used in this work.....	77
Table 2: Composição dos ácidos graxos produzidos durante cada fermentação.....	77
Table 3: Productivity of experiments in bioreactor using cassava water as a carbon source..	78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS E PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	23
3.2 PRODUÇÃO DE MANDIOCA	25
3.3 USO DE LEVEDURAS VERELHAS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	27
3.4 CAROTENÓIDES.....	28
3.4.1 β -caroteno.....	29
3.4.2 Astaxantina.....	30
3.5 OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES A PARTIR DE MICRORGANISMOS	31
3.5.1 <i>Rhodotorula glutinis</i>	32
3.5.2 <i>Paffia Rhodozyma (Xantofilomices dendrohus)</i>	33
3.6 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS CAROTENÓIDES.....	34
4. METODOLOGIA	37
4.1 MATÉRIA-PRIMA	37
4.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA MANIPUEIRA.....	37
4.3 MICRORGANISMOS.....	40
4.4 PREPARO DO INÓCULO.....	41
4.5 CULTIVO EM BIORREATOR	42
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MICROBIANA	43
4.6.1 Consumo de substrato (AR).....	43
4.6.2 Determinação de Biomassa	43
4.6.3 Extração e quantificação de lipídeos.....	43
4.6.4 Análise dos Ácidos graxos.....	44
4.6.5 Extração e quantificação de carotenóides totais.....	44

REFERÊNCIAS.....	46
ARTIGO 1: PRODUCTION OF BIOMOLECULES THROUGH THE MICRO-ORGANISM <i>Rhodotorula glutinis</i> IN A BIOREACTOR USING CASSAVA WATER AS A CARBON SOURCE.....	54
ARTIGO 2: PRODUCTION OF LIPIDS AND CAROTENOIDS IN BIOREACTOR WITH <i>Rhodotorula glutinis</i> AND <i>Paffia rhodozyma</i> USING CASSAVA WATER AS CARBON SOURCE.....	70

1. INTRODUÇÃO

Há uma preocupação por parte da população a respeito da influência da alimentação na saúde e isso tem aumentado o interesse por ingredientes alimentares de origem natural (VALDUGA et al., 2009) e que, portanto, além de nutrir trazem benefícios adicionais à saúde (SIRO et al., 2008). Diante deste cenário, a indústria de alimentos tem buscado alternativas para a substituição de aditivos artificiais, tais como alguns corantes e conservantes, por aqueles obtidos a partir de fontes naturais (MARTINS et al., 2016).

Os carotenoides são importantes pigmentos naturais, produzidos por uma grande variedade de microrganismos e plantas, sendo em sua maioria C40 terpenoides (MAROVA et al., 2012; PARK et al., 2005). Devido as suas propriedades como agentes antioxidantes, anticancerígenos, estimulantes de resposta imune, nutracêuticos e corantes, os carotenoides são amplamente utilizados na medicina e na indústria química, farmacêutica, de cosméticos, de alimentos e de rações (BHOSALE; GADRE, 2001; CUTZU et al., 2013). A descoberta da importância dos carotenoides na prevenção do câncer de próstata e doenças cardiovasculares em humanos tem ganhado atenção global.

Do ponto de vista nutricional, fisiológico e bioquímico, o interesse pelos carotenoides concentra-se principalmente na atividade pró-vitamina A de alguns deles, mas os carotenoides também possuem outras funções biológicas que podem ter efeitos benéficos no tratamento de doenças crônicas. São importantes para o bom funcionamento bioquímico do corpo humano e não podem ser sintetizados pelo organismo naturalmente, embora possam ser modificados parcialmente. Devido essa importância para a saúde há um crescente interesse por parte da indústria por novas tecnologias que permitam uma melhora na sua produção.

Os lipídios microbianos entre muitas outras possibilidades, podem ser utilizados como aditivos alimentares ou mesmo como substituto de óleos vegetais, por exemplo, manteiga de cacau e óleo de palma em várias aplicações industriais. Esses Os lipídios obtidos a partir de microrganismos têm algumas vantagens sobre os lipídios obtidos de fontes vegetais, como ciclo de produção curto, menos mão de obra, o rendimento não é afetado por mudanças sazonais e é relativamente fácil de expandir a escala de produção (Wang; Yang; Wang, 2014).

A utilização de sistemas que empregam leveduras para a produção de moléculas bioativas é uma área emergente e que apresenta um grande potencial para aplicações industriais (MATA-GÓMEZ et al., 2014; WICHUK; BRYNJÓLFSSON; FU, 2014). Diversos processos biotecnológicos têm demonstrado o potencial destes microrganismos para as indústrias de

alimentos e rações, visando à produção de carotenoides (RODRIGUES et al., 2014).

Dois grandes problemas encontrados pela indústria são o alto valor econômico necessário para produção química desse grupo de moléculas e a geração de resíduos resultantes das etapas químicas durante sua produção. Portanto, são importantes as pesquisas que propõem reduzir os custos de produção e contribuir para a preservação do meio ambiente.

O descarte industrial tem se tornado uma das principais causas da poluição ambiental e consequentemente tem sido um dos maiores problemas do mundo moderno, promovido pela enorme formação de resíduos. A gestão dos resíduos gerados após a produção tem sido um problema comum enfrentado pela indústria (MAZURCZAK et al., 2017).

Uma forma de solucionar esse problema é utilizar esses resíduos como fonte de carbono para produção biotecnológica por serem geralmente ricos em sua composição. Um exemplo desse tipo de resíduo são as águas residuais da mandioca, conhecidas como manipueira, que são extraídas a partir da prensa da mandioca durante a produção de farinha (SUMAN et al. 2011).

Neste sentido, diversos pesquisadores têm procurado reaproveitar esse resíduo como fonte de carbono para cultivo microbiano e foram observados resultados interessantes como a biossíntese de lipídeos e carotenoides pelas leveduras vermelhas. Dentre essas leveduras existem duas que estão entre as principais que são a *Rhodotorula glutinis* e a *Xanthophyllomyces dendrorhous* (SILVA et al., 2018). Várias leveduras do gênero *Rhodotorula* foram classificadas como oleaginosas, pois possuem a característica de acumular entre 40-70% (massa/massa) de lipídeos intracelulares (Viñarta et al., 2016).

Leveduras são microrganismos que pertencem à classe dos fungos, são unicelulares, desempenha um papel semelhante ao das bactérias e geralmente consomem matéria orgânica.

A levedura *Paffia rhodozyma* possui destaque na produção de carotenoides devido a sua característica de utilizar diferentes fontes de carbono como substrato para o seu desenvolvimento, possuir um metabolismo rápido, uma taxa de crescimento rápida, facilidade de suas colônias atingirem alta densidade populacional e também por ter recebido o título de GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, é reconhecido como seguro e pode ser utilizado pela indústria de alimentos com segurança.

Uma alternativa bastante utilizada atualmente na produção de carotenoides e lipídeos é o cultivo em biorreator integrado, principalmente pela sua capacidade de otimizar o processo, seu poder de controle das variáveis e pela sua segurança. Este trabalho investigou a produção de lipídeos, carotenoides e biomassa utilizando as leveduras oleaginosas *R. glutinis* e *P.*

rhodozyma, cultivadas individualmente e em consórcio em um biorreator e utilizando a manipueira como fonte de carbono.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a cinética de produção em biorreator de moléculas bioativas por *Rhodotorula glutinis* e *Xanthophyllomyces dendrorhous* como agentes do metabolismo do bioprocesso, utilizando a manipueira como substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química da manipueira;
- Investigar a viabilidade da ampliação de escala de bioprodução de carotenóides utilizando a manipueira como substrato
- Estudar a cinética fermentativa da produção de carotenoides, lipídeos em escala aumentada (aumento de 15 vezes), utilizando individualmente e em co-cultivo as duas leveduras.
- Estudar a produção de biomassa;
- Separar e quantificar os lipídios e carotenoides produzidos;
- Calcular os parâmetros cinéticos da fermentação da produção de carotenoides ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{p/x}$, Q_X , Q_P e F_C).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Os resíduos caracterizam-se como as sobras de um processo que não possuem valor comercial e não são utilizadas em aplicações posteriores na planta industrial, portanto, são tratados e descartados pela indústria (BIFF; SILVA, 2016). Por outro lado, subprodutos caracterizam-se como as sobras do processo que são aproveitadas para a elaboração de outros produtos e sendo assim apresentam um valor comercial baixo, no entanto, bem definido (JUNIOR et al., 2016). As definições de resíduos e subprodutos dependem de fatores socioeconômicos, visto que a depender da região, um resíduo pode passar a ser considerado um subproduto, como ocorre com a manipueira que é utilizada no estado do Pará para a elaboração do tucupí, mas é descartada na região Nordeste.

No Brasil, o maior agronegócio está nos ramos de aves, suínos e bovinos, açúcar e álcool, fumo, têxtil, couro, frutas, algodão e grãos, madeira e celulose, óleo, farinha e conservas (EXAME, 2017). O processamento das matérias-primas dessas agroindústrias geram uma grande quantidade de resíduos sólidos e líquidos, que geralmente são descartados sem nenhuma orientação técnica (SERNA-LOAIZA et al., 2018). Diversos problemas de poluição ambiental e de saúde pública estão relacionados ao descarte inadequado desses resíduos (PÉREZ et al., 2015).

Se forem descartados sem tratamento prévio, incompleto ou ineficiente, os resíduos líquidos gerados durante o processamento de matérias-primas agrícolas, também podem se tornar uma fonte de poluição. Esses efluentes podem conter nutrientes em excesso, sedimentos, matéria orgânica, pesticidas, patógenos, metais pesados e outros diversos contaminantes. Uma vez descarregado em um corpo d'água, afetará a qualidade do abastecimento de água doce (e, portanto, a quantidade de água disponível). O destino dos descartes em rios e lagos geralmente é o oceano, o que tem um impacto negativo para o meio marinho (RYDER, 2017).

Por esse motivo, a comunidade científica tem explorado amplamente a possibilidade de reaproveitar os resíduos e recuperar os compostos de interesse neles presentes. Diversas trabalhos buscam resolver o problema de reaproveitamento de águas residuais agrícolas e industriais utilizando para irrigação (LIONETTO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017), como fertilizantes (DANTAS et al., 2017; TADDEO et al., 2018), produção de biogás (HANSUPALAK et al., 2016; MORENO et al., 2017) biodiesel (NEVES et al., 2016;

TSOLCHA et al., 2018), produção de hidrogênio (ARANTES et al., 2017; PACHIEGA et al., 2019; TORQUATO et al., 2017), biosurfactantes (YAÑEZ-OCAMPO et al., 2017), produção de biomoléculas (RIBEIRO et al., 2019; SILVA et al., 2020) entre outras aplicações.

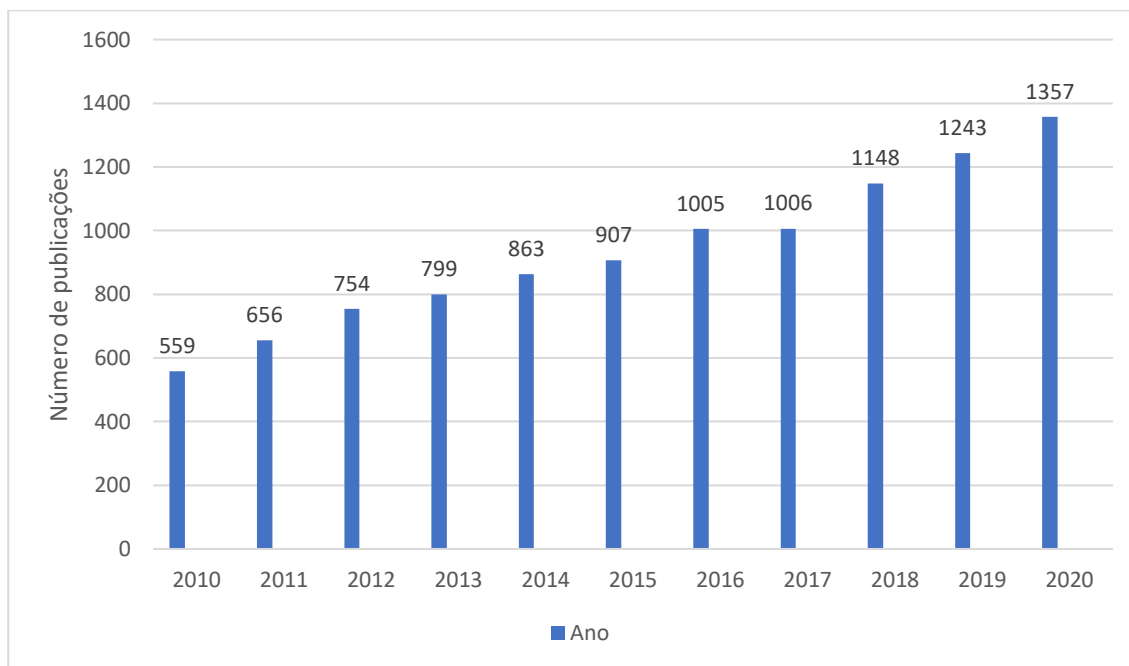
Petrik et al. (2014) observaram que 6 milhões de toneladas de borra de café são produzidas no mundo todos os anos. Portanto foi desenvolvida uma pesquisa onde o subproduto foi pré-tratado com ácido e, em seguida, submetido a hidrólise enzimática. O meio preparado continha 150 g/L de subprodutos e alguns sais ((NH₄)₂SO₄; KH₂PO₄; MgSO₄) ao final da fermentação pode-se obter 3,68 mg/L de carotenoides e 4,28 g/L de biomassa para a levedura *R. Mucilaginosa*.

Kot et al. (2015) constataram que, além de utilizar subprodutos para produção biológica, as leveduras do gênero *Rhodotorula* também podem reduzir sua carga orgânica. Eles usaram a levedura *R. glutinis* para verificar a biodegradabilidade de água residuária de batata desproteinizada (fonte de nitrogênio) com glicerol (fonte de carbono), e obtiveram 77% de redução da DQO (demanda química de oxigênio) e assimilação de 70% de glicerol e 20,34 g/L de biomassa, quando usando 50 g/L de glicerol e 5% da água residual.

Resíduos líquidos agroindustriais geralmente não possuem valor econômico significativo, por isso são considerados inconvenientes pela fonte de geração (BHARATHI; RAMESH, 2013). A destinação correta e a destinação final desses resíduos representam atualmente apenas o custo da indústria em que são produzidos. Aproximadamente 5 bilhões de toneladas de resíduos agrícolas são gerados globalmente todos os anos (KUNG; KONG; CHOI, 2015). A maioria deles não é reaproveitada ou beneficiada, apenas é destinado à decomposição natural, levando ao seu acúmulo, gerando problemas ambientais (DE MORAES et al., 2017).

A possibilidade de aproveitamento desses excedentes da agroindústria tem grande importância ambiental e econômica. Eles representam a fonte de matérias-primas utilizadas para criar novos produtos, (REBECCHI et al., 2013). Nos últimos anos, o tema tem crescido nas pesquisas científicas, e opções viáveis de reutilização estão sendo estudadas para minimizar o impacto ambiental de resíduos agrícolas e industriais. Ao buscar o termo “resíduos agroindustriais” nos campos de Título, Resumo e Palavra-chave na base de dados de literatura da Scopus, tem havido cada vez mais trabalhos sobre o tema nos últimos anos, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1. Número de publicações nos últimos dez anos para o termo *agroindustrial waste*.



Fonte: SCOPUS, (2021) Acessado em 09 Ago. 2021.

Vários resíduos de origem vegetal possuem na sua estrutura lignocelulose, rica em açúcar, que pode ser convertida em açúcares fermentáveis, fonte de energia para a fermentação microbiana. A partir desta transformação, os resíduos são convertidos em produtos de elevado valor agregado, como lipídeos, betacaroteno, astaxantina biofertilizantes e biocombustíveis (CHATZIPAVLIDIS et al., 2013).

A escolha correta do substrato é fundamental para qualquer tipo de cultivo microbiológico. O substrato pode ser escolhido de forma natural ou produzido sinteticamente, dependendo do processo que se deseja realizar, da facilidade de obtenção da matéria-prima ou do resultado que se deseja alcançar. Neste sentido, devido ao baixo ou nenhum valor comercial, o uso de resíduos agroindustriais é justificado.

3.2 PRODUÇÃO DE MANDIOCA

As regiões Norte e Nordeste do Brasil são as principais produtoras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), possuindo milhares de casas de farinha destinadas às pequenas produções (ENBRAPA, 2018), sendo a parte que possui maior importância econômica na planta de mandioca a sua raiz, onde há o acúmulo do amido, que pode ser transformado em farinha. Esses processos, no entanto, geram em média 300 litros de manipueira por tonelada de raiz de

mandioca (CHUZEL, 2001).

A mandioca é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas, possui um sistema radicular tuberoso responsável pelo armazenamento das suas reservas de amido, ela é cultivada e consumida principalmente nos continentes da África, Ásia e América do Sul. Possui um sistema radicular tuberoso responsável pelo armazenamento das suas reservas de amido, ela é cultivada e consumida principalmente nos continentes da África, Ásia e América do Sul. A produção de mandioca no Brasil em 2020 foi estimada em cerca de 19 milhões de toneladas (IBGE, 2021). As regiões Norte e Nordeste do Brasil são as principais produtoras de mandioca, possuindo milhares de casas de farinha destinadas à pequenas produções (EMBRAPA, 2019), considerando que o processamento da mandioca à farinha produz, em média, 300 litros de manipueira por tonelada de raiz (CHUZEL, 2001).

Do processamento das raízes de mandioca para fazer farinha e amido, dois resíduos são gerados: sólidos, que consistem na parte lenhosa das raízes, a parte da fibra retida na peneira e bagaço de mandioca; e líquidos, incluindo a água resultante da prensa da mandioca. Este último é comumente referido como manipueira (INOUE et al., 2011). Manipueira é um líquido residual produzido na prensagem dos pedaços de mandioca triturados, utilizado para a produção da farinha de mandioca, sendo altamente tóxico ao meio ambiente, principalmente pelas elevadas concentrações de ácido cianídrico, altas concentrações de potássio, magnésio, cálcio e fósforo (PINTO; CAMILI; CABELLO, 2010), além de conter 5% a 7% de amido, glicose e outras substâncias orgânicas (carboidratos, proteínas e lipídios) e nutrientes minerais (DA SILVA JÚNIOR et al., 2012).

Leonel e Cereda (1995) relataram em seu trabalho que é possível a utilização com sucesso da manipueira para a produção de produtos biológicos. Jesus et al. (2016) usaram a manipueira como fonte alternativa de carbono para produzir lipase. Os autores relataram que o *Bacillus subtilis* pode produzir lipase por fermentação submersa, utilizando como fonte de carbono a manipueira tratada sem adição de indutor enzimático. A manipueira pode ser utilizada como matéria-prima para processos industriais por conter em sua composição, altas concentrações de carboidratos, nitrogênio e sais minerais (CORDEIRO, 2006).

A composição da manipueira possibilita o crescimento de microrganismos anaeróbios, pois são resistentes a substratos que contêm cianeto. Já os microrganismos aeróbios são sensíveis ao cianeto por interferir na sua respiração impedindo a formação do trifosfato de adenosina (ATP), que através da citocromo oxidase inibe a transferência de elétrons, agindo assim na fosforilação oxidativa (CEREDA et al., 2000).

As características da raiz podem interferir na natureza da manipueira extraída dela. Segundo Correia e Del Bianchi (2008), vários são os agentes que interferem na composição da mandioca, incluindo estação, a natureza do solo, a temperatura, a altitude, a umidade e a variedade da mandioca cultivada.

3.3 USO DE LEVEDURAS VERMELHAS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

A bioprospecção microbiana (ou *screening*) é um dos itens mais importantes quando o assunto é microbiologia industrial, ajudando a entender a biodiversidade, ecologia, metabolismo. Além disso, torna possível a descoberta de microrganismos com grande potencial para a formação de produtos de interesse na indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia e química. Microrganismos são bons produtores de biomoléculas e essa produção possui grandes vantagens para a indústria pela possibilidade de produção em curto período de tempo, em qualquer época do ano, em pequeno espaço, usando substratos de baixo custo, além de permitir o controle das condições de cultivo (VALDUGA et al., 2014).

Leveduras são microrganismos que pertencem à classe dos fungos, são unicelulares, desempenha um papel semelhante ao das bactérias e geralmente consomem matéria orgânica. No entanto, eles são diferentes em termos de tamanho e características morfológicas (REED; PEPPER, 1973). As leveduras oleaginosas, principalmente as vermelhas, podem produzir lipídeos com ácidos graxos semelhantes aos óleos vegetais, com ácidos graxos saturados e monoinsaturados, e a cadeia formada principalmente por 16 a 18 átomos de carbono (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). Várias leveduras podem ser classificadas como oleaginosas, para isso, elas devem possuir a capacidade de produzir e acumular mais de 20% de ácidos graxos, em seu interior (MENG et al., 2009; RATLEDGE; WYNN, 2002)

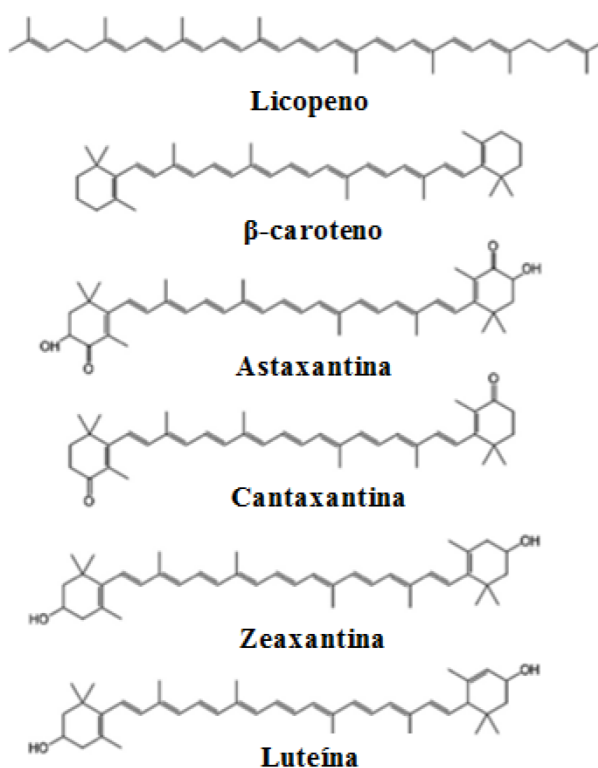
Segundo Beopoulos et al., (2009), os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Yarrowia* são as leveduras oleaginosas mais conhecidas e são capazes de acumular cerca de 40% de lipídeos (em relação à sua biomassa) em inclusões lipídicas intracelulares, ao passo que em condições de estresse, este acúmulo pode chegar a 70%.

Dentre os microrganismos de interesse industrial, a levedura é o microrganismo mais utilizado. Eles são cultivados para a obtenção das próprias células, componentes celulares e produtos finais durante o processo de fermentação, que constituem os principais grupos microbianos utilizados na fermentação de alimentos e bebidas (SICARD; LEGRAS, 2011).

3.4 CAROTENOIDES

Os carotenoides (Figura 2), são os responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho em vegetais, possuem cadeias de 40 carbonos e sua principal característica química é a presença de um polieno de cadeia longa (onde a presença de duplas ligações varia de três até quinze) que é responsável pela cor percebida pelo olho humano (KRINSKY; JOHNSON, 2005). Para as indústrias farmacêutica, cosmética, química e de alimentos, os carotenoides representam um grupo de moléculas valiosas, não só por agirem como percussores da vitamina A, mas também por suas ações como antioxidantes, corantes e melhoradores da resposta imune, levando a prevenção de doenças e a proteção contra infecções por bactérias e fungos (AKSU; EREN, 2007; MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

Figura 2. Estrutura molecular dos principais carotenoides

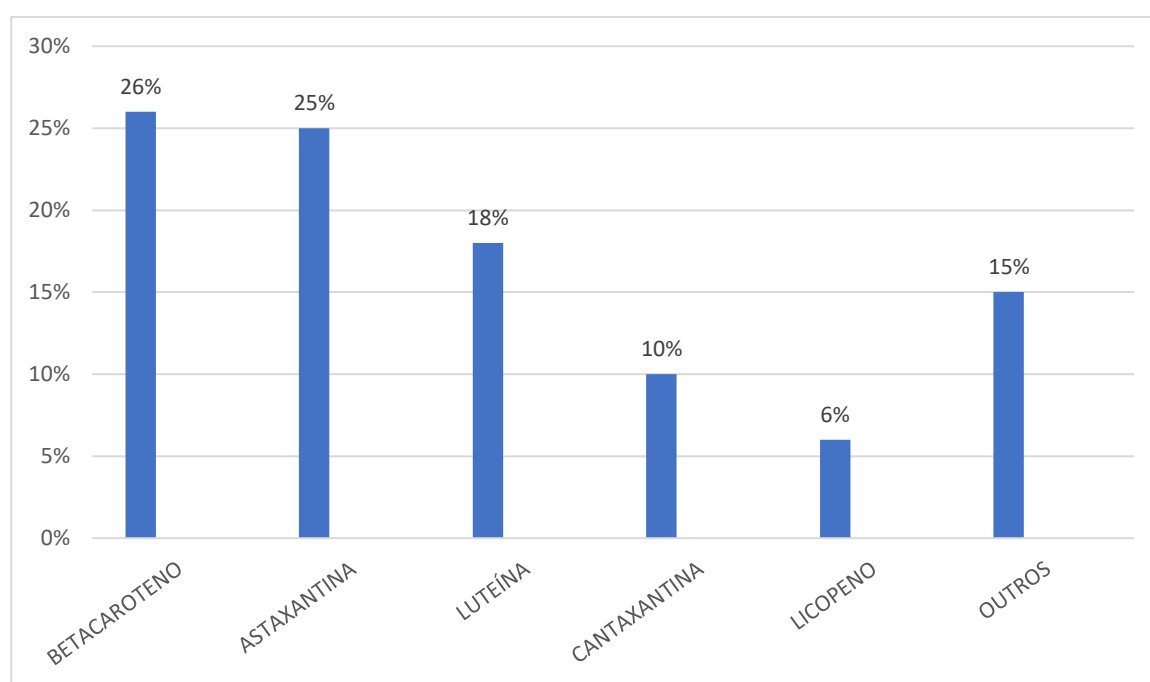


Fonte: Adaptada (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014a)

Em 2015, a receita global de carotenoides atingiu 432,2 milhões de dólares americanos, dos quais as algas representaram 35% (HU, 2019). Em 2018, a receita de β -caroteno sintético

do mercado global foi de US \$ 223,9 milhões, e estima-se que, em 2027, a taxa composta de crescimento anual de β -caroteno será de 3,5% (MARKET, 2018). Já em 2019, a receita geral de β -caroteno chegou a US \$ 532 milhões (HU, 2019). A perspectiva para 2021 da participação de carotenoides, separados por cada tipo, no mercado global está na Figura 3 onde existe uma importante estimativa de participação do betacaroteno e da astaxantina segundo Rammuni et al. (2019). Portanto, existe um interesse no desenvolvimento de processos visando uma produção eficiente destes compostos (MANNAZZU et al., 2015).

Figura 3. Estimativa de participação de carotenoides no mercado mundial em 2021



Fonte: Rammuni et al. (2019).

Assim, diversas alternativas têm sido estudadas para a obtenção de carotenoides com custos mais reduzidos, podendo-se destacar a produção por via microbiana utilizando-se microalgas, bactérias e fungos (VALDUGA et al., 2009).

3.4.1 β -caroteno

O β -caroteno é responsável pela característica alaranjada nos alimentos, comumente encontrado em plantas e em tecidos de animais. Segundo Malisorn e Suntornsuk (2009) o β -caroteno é considerado um nutriente essencial devido as suas funções biológicas e ao seu papel

como precursor da vitamina A e de hormônios. A vitamina A é importante para o corpo humano, auxiliando o sistema imunológico e consequentemente prevenindo algumas doenças como alguns tipos de câncer e doenças nos olhos e na pele (AGARWAL; RAO, 2000). O β -caroteno possui no organismo humano atividade antioxidante e assim ajuda a reduzir os efeitos dos radicais livres, evitando o envelhecimento precoce (TÖRNWALL et al., 2004). Devido as suas propriedades antioxidante e sua função como corante o β -caroteno é amplamente utilizado na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica em cosméticos e fármacos (MALISORN; SUNTORNSUK, 2009).

3.4.2 *Astaxantina*

Este carotenoide de coloração vermelha é encontrado em alguns pescados, como camarão, lagosta e salmão, sendo responsável pela coloração vermelho-rosada destes animais, além de poder ser biossintetizado por microalgas, representando o primeiro nível de produção no ambiente aquático, (CHEN et al., 2009). A astaxantina é um carotenoide pertencente à família das xantofilas que pode ser encontrado em grande quantidade na microalga *Haematococcus pluvialis* e em microalgas do gênero *Chlorella* (PARK; LEE, 2001). Apesar de poder ser sintetizada por plantas, bactérias e alguns fungos, a microalga *H. pluvialis* possui a maior capacidade para o acúmulo de astaxantina na célula, podendo-se obter de 4 a 5% em relação a sua biomassa seca (YUAN et al., 2011). A astaxantina possui atividade antioxidante e diversos estudos têm demonstrado os efeitos positivos da astaxantina para a prevenção e tratamento de várias doenças como, câncer, doenças crônicas inflamatórias, síndromes metabólicas, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e doenças nos olhos e na pele (RAO et al., 2013). O interesse pelo uso da astaxantina como corante natural na indústria de alimentos e como aditivo em rações para a aquicultura tem crescido nos últimos anos. Sua molécula apresenta dois grupos carbonila, dois grupos hidroxila e onze duplas ligações etilênicas conjugadas (Figura 2). Este sistema polieno confere a astaxantina a sua capacidade de absorção da luz (IP; CHEN, 2005). A astaxantina pode agir como um forte antioxidante através da doação de elétrons para radicais livres tornando-os produtos mais estáveis, bloqueando a reação em cadeia destes radicais em uma ampla variedade de organismos vivos (YUAN et al., 2011).

3.5 OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES A PARTIR DE MICRORGANISMOS

Por um longo período extratos de plantas estiveram sendo utilizados como fontes de pigmentos carotenoides, particularmente β -caroteno e xantofilas (WICHUK; BRYNJÓLFSSON; FU, 2014). Embora plantas ainda sejam importantes fontes de carotenoides naturais, vários processos microbiológicos têm sido comercialmente explorados para a obtenção de tais compostos (CAMPENNI et al., 2013). O controle de processos microbiológicos em reatores é mais fácil e mais eficiente, enquanto a produção de culturas vegetais é mais propensa a intempéries do ambiente (clima) e de grandes espaços de plantio, ficando mais difícil de se controlar.

A função mais importante dos carotenoides nas leveduras é a proteção contra a combinação prejudicial do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) com a luz visível ou UV (BERERA et al., 2010). Sua síntese e armazenamento é intracelular e a ação destas moléculas está em desativar os radicais livres produzidos durante o metabolismo normal das células, tais como o $^1\text{O}_2$, o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), peróxidos e outros oxidantes por meio de um processo no qual a energia é transferida de altos níveis de excitação para uma molécula de carotenoide, a qual pode retornar ao estado fundamental liberando calor (BERERA et al., 2010). Moliné et al. (2009) estudaram o papel fotoprotetor dos carotenoides em leveduras através da comparação das respostas à radiação UV-B de células pigmentadas e albinas naturais. O estudo foi realizado com diferentes tempos de exposição à radiação UV-B, em vários estágios do crescimento da levedura. Da mesma forma avaliaram a produção de carotenoides por fotoindução e o efeito da radiação UV-B na sobrevivência das leveduras. Estes autores observaram que as cepas pigmentadas são mais tolerantes a radiação do que as cepas albinas e que o aumento no teor de carotenoides durante a fase de crescimento estacionário beneficiou a sobrevivência das leveduras.

A produção de carotenoides pela levedura *R. glutinis* cultivada em diferentes subprodutos agroindustriais vem sendo estudada. Malisorn e Suntornsuk (2009), aplicaram um planejamento composto central rotacional para otimizar as condições de cultivo para a levedura *R. glutinis* DM28, tendo como resposta a produção de β -caroteno. Neste trabalho, os experimentos foram conduzidos em um tanque reator com agitação e a salmoura de rabanete fermentado foi utilizada como substrato. Os autores observaram que as condições ótimas para a produção de β -caroteno (201 $\mu\text{g/L}$) foi de 30 °C, pH 6 e 80% de oxigênio dissolvido.

O desenvolvimento e otimização dos processos fermentativos para produção de carotenoides tem a finalidade de aumentar o rendimento e, assim diminuir os custos de

produção. Embora a variedade de microrganismos produtores de carotenoides seja grande, apenas alguns microrganismos são industrialmente interessantes, como as leveduras.

A grande capacidade que as leveduras tem de crescer em vários substratos como resíduos agroindustriais, tornam-nas microrganismos promissores para a produção de carotenoides. A descoberta da produção de biomoléculas por meio de leveduras na década de 1960 e a elucidação das estruturas químicas dos pigmentos fizeram com que o interesse em produzir carotenoides por leveduras aumentasse (MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

Segundo Subramaniam et al. (2010), são vários os fatores que interferem no teor de lipídeos e carotenoides durante a fermentação e são eles: composição do meio, fatores ambientais incluindo aeração, pH, temperatura, tamanho do inóculo e período de incubação, sendo que o fator mais determinante na produção dos biocompostos é o microrganismo utilizado. A este respeito, demonstrou-se que os lipídeos produzidos por *Rhodotorula glutinis* podem ser utilizados como matéria-prima na indústria de alimentos e de ração animal, podendo também ser empregados nutricionalmente como fonte importante de ácidos graxos (Ribeiro et al, 2019). Até mesmo agentes químicos têm sido utilizados com o simples objetivo de gerar estresse no momento da fermentação com a finalidade de otimizar a produção de metabólitos intracelulares. Pupo et al. (2017) usando 4-metilciclohexanometanol bruto induziu o acúmulo de metabólitos intracelulares, por meio de seus efeitos no metabolismo de aminoácidos. Parâmetros físicos, nutricionais, concentrações de vitaminas e minerais, pH, luz estresse, aeração, temperatura, irradiação, radiação e etc., são também estudados pelo fato de influenciarem o metabolismo das leveduras (BUZZINI, 2000; MALISORN et al., 2008). Shekhawat et al. (2019) avaliaram o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lachancea thermotolerans* em cultura mista em biorreator onde as fermentações foram feitas em condições cuidadosamente controladas para reduzir respostas que poderiam ser causadas por outros fatores além da presença da segunda espécie. A fermentação mista gerou um ambiente mais competitivo e estressante para as duas leveduras e criou um conjunto diferente de desafios para o seu crescimento gerando assim uma maior produção de metabólitos celulares.

3.5.1 *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis é um microrganismo aeróbico capaz de produzir carotenoides em suas células, como fruto do seu metabolismo, sintetizando o β -caroteno, o toruleno e a torularrodina como carotenoides principais (AKSU; EREN, 2007). Esta levedura apresenta alto

potencial para ser utilizada na indústria de alimentos por ser uma fonte de moléculas de alto valor comercial, como: proteínas presentes em sua massa celular, pigmentos naturais e ácidos graxos insaturados como os ácidos oleico, linoleico e linolênico (SAENGE et al., 2011). Devido à capacidade natural de produção deste gênero, além da produção de lipídeos, ele também tem a capacidade de produzir diversos compostos industriais-alvo e, portanto, há pesquisas aprofundadas sobre este gênero. Não obstante, o gênero *Rhodotorula* também produz carotenoides, enzimas e terpenos (Park et al., 2017). O emprego deste microrganismo em processos biotecnológicos voltados para a obtenção destes compostos tem sido amplamente estudado e resultados atrativos têm sido obtidos a partir destas investigações. Cutzu et al. (2013) avaliaram a produção de carotenoides por *R. glutinis* em meio de cultura contendo glicerol e obtiveram uma produção máxima de carotenoides 14 mg/L.

Esta espécie pertence ao filo *Basidiomycota*, classe *Urediniomycetes* e ordem esporídica. As células possuem um diâmetro de três a cinco micrômetros, com formato elíptico, brotação multipolar, produzindo pseudo-hifas e apresentam reprodução sexual com conexão micelial da braçadeira e teliosporos. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são encontradas no ar, no solo e em frutas e folhas, podendo ser encontradas também em leite e derivados (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014b).

3.5.2 *Paffia Rhodozyma (Xanthophilomices dendrorhous)*

Esse microrganismo foi isolado no início do ano de 1970 a partir de material expelido de árvores em regiões montanhosas do Japão e Alaska. Foi originalmente designada “*Rhodozyma montanae*”, mas suas características incomuns e a falta de uma descrição em latim levou a uma mudança deste gênero para *Phaffia*, em homenagem a Herman Jan Phaff. Desde então basidiósporos e conjugações foram observados na *P. rhodozyma*, o novo nome *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi recentemente proposto (JOHNSON, 2003).

Pertence à classe dos basidiomicetos, possui células isoladas de forma elíptica, podendo estar isoladas ou aos pares. A composição da sua parede celular é multicamada sendo formada por polissacarídeos (Miller et al., 1976). A cor da célula intacta da levedura *Phaffia rhodozyma* é laranja para vermelho alaranjado devido à presença de carotenoides, principalmente astaxantina no citoplasma (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2010). Entre os organismos produtores de astaxantina, somente a alga verde *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* são atualmente consideradas de interesse industrial.

A levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* produz principalmente o carotenoide astaxantina, que apresenta bastante interesse no meio científico e industrial por ter capacidade antioxidante biológica bem mais potente que os outros carotenos. O microrganismo *Xanthophyllomyces dendrorhous*, apresenta potencial adequado para o uso como fonte de produção de carotenoides em razão do seu padrão de crescimento relativamente rápido, seu metabolismo heterotrófico, habilidade para alcançar alta densidade celular em fermentadores industriais, qualidade nutricional e segurança como aditivo alimentar (BONFIM, 1999), possuindo a aprovação como um microrganismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) nos Estados Unidos. Portanto, a produção de astaxantina a partir de fontes naturais, como esta levedura, é uma alternativa em potencial para a substituição da obtida por via sintética (BIFF; SILVA, 2016).

3.6 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS CAROTENOIDES

É importante para a indústria tanto a bioprodução de carotenoides quanto métodos que promovam a recuperação de alta eficiência e baixo custo, porém, as etapas de recuperação e extração do produto ainda carecem de tecnologias alternativas, principalmente no processo de produção de carotenoides intracelulares, visando otimizar a taxa de recuperação, ajudando a reduzir os custos operacionais (PETRIK et al. 2014)

A parede celular é uma camada relativamente dura encontrada nas células de plantas e microrganismos, como bactérias, algas, fungos e leveduras. Além de estar relacionado à sinalização celular, adesão e digestão extracelular, também fornece suporte osmótico e determina a forma das células (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005).

A levedura é envolvida por uma parede celular dura, que representa cerca de 20 - 25% do peso celular seco. Na maioria das leveduras, a parede celular é composta por 85 - 90% de polissacarídeos e 10 - 15% de proteínas (NGUYEN; FLEET; ROGERS, 1998). Os carotenoides produzidos pela maioria dos organismos estão presentes nas células, portanto, para extrair os carotenoides, esta parede deve ser efetivamente quebrada (MICHELON et al., 2012).

A extração de carotenoides com solventes orgânicos é um dos métodos mais utilizados (ZAGHDOUDI et al., 2015). Park et al. (2007) mostraram que a extração de carotenoides presentes nas paredes celulares dos microrganismos depende da habilidade do solvente em penetrar na parede celular e da solubilidade dos carotenoides com o solvente utilizado. No entanto, com o aumento das restrições ao uso de solventes, muitas vezes tóxicos, o interesse do

consumidor em produtos naturais levou à exploração de outros métodos de extração (SUN; TEMELLI, 2006).

Michelon et al. (2012) compararam os efeitos de diferentes tecnologias de ruptura celular (métodos físicos, químicos, enzimáticos e combinados) de extração de carotenoides de *Phaffia rhodozyma*. Os melhores resultados (195,35 µg/g) foram obtidos quando a tecnologia combinada de maceração de biomassa congelada e pérolas de vidro foram usadas em conjunto com solventes químicos.

Outra tecnologia que pode ser usada para rompimento celular é o sistema de ultrassom, que inclui um processo que utiliza energia ultrassônica. A frequência de transmissão do ultrassom é superior à frequência da capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz). As ondas ultrassônicas se propagam pela matéria, produzindo compressão e expansão, fazendo com que as moléculas se separem e se aproximem (LUENGO et al., 2014; LUQUE-GARCIA; DE CASTRO, 2003). O ultrassom aumenta a permeabilidade da parede celular e produz cavitação, levando a um forte estresse dinâmico, aumentando assim o estresse mecânico da célula, também conhecido como atrito interfacial. O ultrassom destrói a parede celular, aumenta a penetração do solvente e o contato entre a fase soluto/solvente, promove assim a liberação do extrato (JACQUES et al., 2007; SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012). Além disso, o ultrassom pode ser utilizado para aumentar efetivamente a taxa de extração, aumentar a taxa de transferência de massa e possível ruptura da parede celular, pois a formação de microcavidades leva a maiores rendimentos, reduzindo o tempo e o consumo de solvente (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012).

No estudo da extração de carotenoides de *X. dendrorhous*, Urnau et al. (2018), observaram que o nível máximo de recuperação de 697 µg/g foi obtido em um meio de produção biológica usando um sistema ultrassônico para ruptura celular (40 KHz, 56 minutos e 22 °C) e extração com acetona: metanol (7:3, v/v). Silva et al. (2009) utilizaram dimetilsulfóxido (DMSO) e homogeneização em vórtice para avaliar a ruptura celular da levedura *P. rhodozyma*, e obtiveram um nível máximo de recuperação de 538 µg/g de um carotenoide específico.

Depois que as células são quebradas, os carotenoides devem ser extraídos das células microbianas. Como os carotenoides são lipossolúveis, geralmente são extraídos com solventes orgânicos, como acetona, éter de petróleo, hexano e etanol (MENDES-PINTO et al., 2010). A escolha do solvente é muito importante para a obtenção de extratos de alta qualidade, e deve ser não-inflamável, não-tóxico e não-volátil. Porém, é difícil encontrar solventes que atendam a todas essas características (SANCHEZ CAMARGO, 2010). Monks et al. (2012) avaliaram a

mistura de acetona: metanol (7:3 v/v), etanol: diclorometano (1:3 v/v) e etanol: acetato de etila (1:3 v/v), obtendo melhores resultados nos experimentos com acetona: metanol, com um conteúdo de carotenoides de 2875,23 µg/L.

4. METODOLOGIA

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em João Pessoa, Paraíba. A manipueira utilizada para a pesquisa foi fornecida pela casa de farinha "Folha Verde" localizada em Sobrado, Paraíba (07° 08 '43 "S, 35° 14' 11" W). A manipueira foi coletada imediatamente após a prensa (Figura 4) da mandioca durante a produção da farinha, foi envasada em frascos e congelada a -5 °C.

Figura 1. Produção, coleta e envase da manipueira.



Fonte: Autor (2020)

Antes da utilização da manipueira nos experimentos, com o intuito de clarificar o resíduo, foi realizado um pré-tratamento, onde a amostra foi aquecida a 100 °C por 20 minutos, resfriada e centrifugada a 3248 *g* por 5 minutos, coletando-se o sobrenadante e descartando o resíduo sólido remanescente. Em seguida, foi diluída com água destilada até atingir a concentração de açúcares redutores padrão (g/L) para o início de todos os experimentos, de acordo com Ribeiro et al. (2018), que determinou 10 g/L como a concentração de açúcar redutor ótima para diluição da manipueira para o cultivo.

4.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA MANIPUEIRA

4.2.1 AÇÚCARES REDUTORES, NÃO REDUTORES E TOTAIS

Para determinação dos açúcares redutores e não redutores, utilizou-se uma modificação do método do DNS, que foi proposto por Miller (1959).

Preparo das soluções utilizadas:

Para a solução de NaOH 2 mol/L foi utilizado um Bécker de 250 mL e foram pesados 8 g de NaOH PA e dissolvidos com 50 mL de água destilada em banho com água fria. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e aferida com água destilada.

Para o preparo da solução de DNS, foram pesados 5 g de DNS (ácido 3,5 – dinitro-salicílico) e adicionados 100 mL de NaOH 2 mol/L, em Becker de 250 mL. Em um Bécker de 500 mL foram pesados 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio e dissolvidos em 250 mL de água destilada. A solução foi levada para aquecimento até dissolver completamente e a ela foi adicionado à solução de DNS sob aquecimento até dissolver completamente. Deixou-se esfriar, e aferiu-se em balão de 500 mL com água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro sob condições mínimas de luz.

Para confecção da curva padrão do reagente foram pesados 100 mg (0,1 g) de glicose e dissolvidos em 100 mL de água destilada em balão volumétrico. Após agitação vigorosa para homogeneizar, transferiu-se 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e 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 absorbância foi lida a 540 nm. Com os valores de absorbância, foi construída a curva de absorbância *versus* concentração.

Durante a análise das amostras, inicialmente 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 a leitura imediatamente a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução. Efetuaram-se os cálculos para expressar os resultados em gramas de açúcares redutores por litro de amostra inicial. Quando a amostra tem sacarose em sua composição 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). As análises foram feitas em triplicata.

4.2.2 UMIDADE

Para quantificação do percentual de umidade foi utilizado o método de secagem em estufa comum (AOAC, 1990). Foram pesados 5 g da manipueira totalmente líquida, bem homogeneizada, em cápsulas de alumínio codificadas, previamente secas e taradas, anotando-se a massa das cápsulas e da amostra, e logo em seguida as cápsulas foram levadas para a estufa a 105 °C. Após 24 h, as cápsulas foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador durante 20 min para esfriar, em seguida pesadas e anotou-se a massa final para efetuar-se os cálculos. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3 CINZAS

Cadinhos de porcelana vazios foram colocados em mufla e deixados a 550 °C, durante 15 min, em seguida foram deixados em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Foram pesados vazios e com 5 g da amostra, anotando-se ambas as leituras. Logo após a pesagem, os cadinhos foram levados à mufla durante aproximadamente 6 h, a 550 °C, ou até o clareamento da cinza. Logo após os cadinhos foram retirados da mufla e colocados diretamente no dessecador para que atingissem a temperatura ambiente, novamente pesados, anotando-se as leituras finais para efetivação do percentual de cinzas na amostra (AOAC, 1990) e as análises foram feitas em triplicata.

4.2.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, onde as leituras foram feitas a 595 nm (BRADFORD, 1976). Neste método ocorre ligação do corante azul de Cromassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto

ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular complexa, ou seja, de 8 - 9 ligações peptídicas no mínimo. A ligação ocorre em dois minutos, e essa dura aproximadamente duas horas (Bradford, 1976). As análises foram feitas em triplicata.

4.2.5 DETERMINAÇÃO DO pH

Para o ajuste do pH da manipueira, utilizou-se um pHmetro digital (DIGIMED DMPH-2). Foi tomado o cuidado de realizar a calibração do eletrodo em solução tampão dentro do prazo de validade, com pH 7,0 e 4,0 e só então foi realizada a leitura

4.2.6 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (°BRIX),

A concentração de sólidos solúveis totais foi medida em °Brix. Adicionou-se 1 mL da amostra a 9 mL de água destilada e, após homogeneização, foi realizada a leitura em refratômetro. O resultado foi multiplicado por dez, devido à diluição, a fim de determinar o teor de sólidos solúveis do resíduo (AOAC 1990).

4.2.7 MASSA ESPECÍFICA

A determinação da massa específica da manipueira foi realizada pela medição da massa e do volume ocupado pela mesma (Equação 1). Foi colocado manipueira em uma proveta de 100 mL, e pesou em balança. Ao completar os 100 mL a massa foi anotada. O cálculo da densidade é obtido pela Equação 1.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{eq: 1})$$

Onde:

m = massa (g);

V = volume (mL);

4.3 MICRORGANISMOS

As leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Paffia rhodozyma*, foram adquiridas da coleção da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil) e foram armazenadas no Laboratório de Processos Biotecnológicos do Centro de Tecnologia (CT) da Universidade Federal da

Paraíba (UFPB).

As leveduras foram obtidas na forma liofilizada, hidratadas por 10 dias, a uma temperatura de 30 °C, em meio YM, contendo: 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10,0 g/L de glicose. Depois deste período as células foram transferidas com uma alça esterilizada para placas de Petri contendo o meio YM com 2% de ágar bacteriológico (meio YMA). As placas foram incubadas de forma invertida a 30 °C por 48 horas e armazenadas em refrigeração a 5 °C até o momento dos experimentos (RIBEIRO, 2018).

4.4 PREPARO DO INÓCULO

Inicialmente cada microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 300 mL (Figura 5) contendo 100 mL de meio de cultura sintético (meio YM): glicose (10 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (3 g/L) e extrato de malte (3 g/L). Esses frascos foram incubados a 30 °C, foram agitados a 3 g durante 24 h. Posteriormente, foram coletadas as células de levedura por centrifugação a 1182 g durante 5 min. As células foram suspensas em água estéril destilada para fazer uma concentração celular final de aproximadamente 10^9 células/mL. A câmara Neubauer foi utilizada para determinação da concentração de células desta suspensão. Durante a realização do cultivo misto o inóculo foi composto por 50% de células do microrganismo *Paffia rhodozyma* e 50% de células de *Rhodotorula glutinis*.

Figura 2. Preparo do inóculo em meio YM



Fonte: Autor (2020)

4.5 CULTIVO EM BIORREATOR

Ribeiro (2018) estudou o processo de produção de biomassa e carotenoides utilizando o microrganismo *Rhodotorula glutinis* em Erlenmeyer de 200 mL e a manipueira como substrato. Esta proposta teve como finalidade estudar a ampliação de escala experimentalmente de 0,2 L para 3 L (15 vezes) e, portanto, foi utilizado o biorreator Tecnal Tec-Bio-V 4,5L (Figura 6). Os parâmetros estudados por Ribeiro (2018) foram usados como padrão. O biorreator previamente esterilizado foi acionado e se manteve durante toda a fermentação em 30 °C e 150 rpm. Com o objetivo de aumentar a concentração de nitrogênio foi feita uma suplementação com Sulfato de Amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração de 5 g/L no início da fermentação (RIBEIRO, 2018). Os cultivos foram realizados em duplicata.

Figura 3. Biorreator utilizado nos ensaios de produção de carotenoides.



Fonte: Autor (2020)

Os experimentos foram realizados em duplicata e antes da inoculação do microrganismo no biorreator, foi tomado o cuidado de autoclavar o biorreator a 121 °C por 15 minutos e após o seu resfriamento as células foram inoculadas ao meio para que a fermentação fosse iniciada com uma concentração celular de 10^7 células por mL.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MICROBIANA

4.6.1 *Consumo de substrato (AR)*

Para analisar o consumo do substrato durante a fermentação foi utilizado uma modificação do método DNS originalmente proposto por Miller (1959). As análises foram feitas a cada 12 h (0, 12, 24, 36, 48, 72, 84 e 96 horas) e para isso utilizou-se alíquotas de 0,5 mL da amostra e 0,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), incubado por 5 minutos a 100 °C. A mistura foi resfriada com um banho de gelo e a leitura da absorbância foi feita após a diluição com água destilada utilizando um espectrofotômetro a 540 nm.

4.6.2 *Determinação de Biomassa*

Foram retiradas amostras do cultivo (alíquotas de 2 mL) para análise de concentração de células (g/L) e cinética microbiana durante os intervalos de tempo de 0, 12, 24, 36, 48, 72, 84 e 96 horas. Cada amostra foi centrifugada a 11200 *g* por 3 min, onde o crescimento analisado por meio da análise da turbidez do meio em espectrofotômetro modelo U2M Quimis no comprimento de onda de 600 nm. O meio sem as células, e na mesma diluição das amostras, foi utilizado como branco (RIBEIRO, 2018). Para a quantificação da concentração de biomassa no meio foi utilizada uma curva padrão com os valores de densidade ótica em função da concentração de biomassa seca e todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.6.3 *Extração e quantificação de lipídeos*

Os lipídeos totais foram analisados após o termino do cultivo (84 h após o inóculo) e para isso utilizou-se o método de Bligh; Dyer (1959), as células passaram por centrifugação a 1182 *g* por 5 min, foram secas em estufa a 105 °C por 24 h sendo na sequência maceradas em um almofariz para se obter um pó fino. A ruptura celular foi realizada por meio de hidrólise ácida e, portanto 5 mL de HCl 2 N foram adicionados à 200 mg da amostra seca e incubados em um banho-maria a 80 °C (modelo 105 Di-F, Dellta) pelo tempo de 1 h. Os lipídios foram extraídos com 11,6 mL de uma mistura com a proporção 1:1:0,9 de clorofórmio: metanol: água destilada.

4.6.4 *Análise de Ácidos graxos*

A transesterificação dos lipídeos em FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Hartman e Lago (1973). Os FAMES foram analisados usando um GC-FID (Trace™ 1310, Thermo Fisher Scientific, EUA) equipado com uma coluna capilar SP™-2380 (60 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme). Diferentes picos foram identificados por comparação com um padrão FAME (Supelco® Component FAME Mix, EUA), quantificados e normalizados de acordo com suas respectivas áreas de pico.

4.6.5 *Extração e quantificação de carotenoides totais*

As determinações dos carotenoides totais foram feitas a cada 12 h após o inóculo através da análise de 5 mL da amostra, coletada e transferida em seguida para um tubo Falcon de 50 mL. Logo após realizou-se a centrifugação, foi descartado o sobrenadante. A Figura 7 mostra as células após o cultivo misto onde pode ser observado os metabolitos em forma de um ponto brilhante no meio intracelular. Com a finalidade de romper a membrana celular foram adicionados 2 mL de dimetilsulfóxido a 60 °C e 0,5 g de pérolas de vidro. Posteriormente, o conjunto foi agitado em vórtex por 2 min. Em seguida, foi realizado a incubação do sistema a 60 °C por 15 min. Após esse momento de incubação, foram adicionados 2 mL de éter de petróleo e mais uma agitação de 2 min foi realizada. Para finalizar, foram adicionados 2 mL de solução de NaCl 20% (m/v) e agitado em vórtex por 1 min. O conjunto foi então centrifugado a 1452 g por 10 min e então foram retiradas 3 mL do sobrenadante e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro (450 nm). Neste momento a absorbância foi então convertida em concentração através da Equação 2.

$$\text{Carotenoides totais} = (A \times V \times 104) / (a \times m) \quad (2)$$

Em que:

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

A: absorbância a 450 nm;

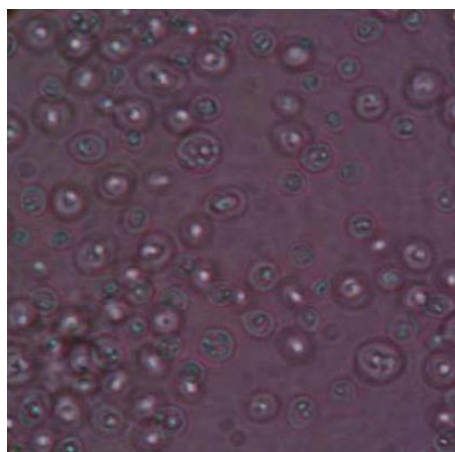
V: volume de extrato da amostra (L);

m: massa de amostra (kg);

a: absortividade molar da espécie química (carotenoides em geral = 2592 (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004) e astaxantina = 2100 (SEDMAK,

WEERASINGHE & JOLLY, 1990).

Figura 4. Cultivo misto com os microrganismos *Rhodotorula glutinis* e *Paffia rhodozyma* após cultivo em biorreator, com aumento de 100×.



Fonte: Autor (2020)

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Cmaj**, v. 163, n. 6, p. 739–744, 2000.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical engineering journal**, v. 35, n. 2, p. 107–113, 2007.
- AOAC. **Association of official analytical chemists. Official methods of analysis** AOAC Arlington, VA, , 1990.
- ARANTES, M. K. et al. Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 42, p. 26243–26256, 2017.
- BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 6, p. 375–387, 2009.
- BERERA, R. et al. The light-harvesting function of carotenoids in the cyanobacterial stress-inducible IsiA complex. **Chemical Physics**, v. 373, n. 1–2, p. 65–70, 2010.
- BHARATHI, K. S.; RAMESH, S. T. Removal of dyes using agricultural waste as low-cost adsorbents: a review. **Applied Water Science**, v. 3, n. 4, p. 773–790, 2013.
- BHOSALE, P.; GADRE, R. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55.4: 423-427.
- BIFF, S.; SILVA, M. R. DA. Use of solid waste from sand beneficiation process in the ceramic tile industry and its influence on the physical properties of the ceramic products. **Revista Materia (Online)**, v. 21, n. 4, 2016.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BONFIM, T. M. B. Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo. **Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUZZINI, Pietro; MARTINI, Alessandro. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource technology*, 2000, 71.1: 41-44.
- CAMPENNI, L. et al. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1383–1393, 2013.
- CEREDA, M. P. et al. Characterization of edible films of cassava starch by electron microscopy. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 91–95, 2000.
- CHATZIPAVLIDIS ET AL. Iordanis et al. Status and trends of the conservation and sustainable use of microorganisms in agroindustrial processes. p. Disponível em:

<<http://www.fao.org/docrep/meeting/>, 2013.

CHEN, T. et al. Employment of organic acids to enhance astaxanthin formation in heterotrophic *Chlorella zofingiensis*. **Journal of food processing and preservation**, v. 33, n. 2, p. 271–284, 2009.

CHUZEL, G. The cassava processing industry in Brazil: Traditional techniques, technological developments, innovations and new markets. 2001.

CORDEIRO, G. Q. Tratamento de manipueira em reator anaeróbio compartimentado. **Dissertação de mestrado programa de Pós-graduação Engenharia e Ciência de Alimentos - IBILCE Orientador Bianchi, Vanildo Luiz Del**, 2006.

CORREIA, G. T.; DEL BIANCHI, V. L. Tratamento biológico de água residuária da produção de farinha de mandioca utilizando reator anaeróbico compartimentado vertical (RACOV). **Semina: Ciências Exatas e da Terra**, v. 29, n. 2, p. 159–166, 2008.

CUTZU, R. et al. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 1009–1017, 2013.

DA SILVA, J. et al. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. 2018.

DA SILVA JÚNIOR, J. J. et al. Uso da manipueira na bananeira ‘terra maranhão’ e seus efeitos no solo e na produtividade. **Irriga**, v. 17, n. 3, p. 353–363, 2012.

DANTAS, M. S. M. et al. Production and morphological components of sunflower on soil fertilized with cassava wastewater. **Revista Ceres**, v. 64, p. 77–82, 2017.

JESUS, M. V. et al. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. **Scientia Plena**, v. 12, n. 5, 2016.

DE MORAES, S. L. et al. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT: Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 4, 2017.

ENBRAPA, E. B. DE P. A. Mandioca em números. **Obtido em 26 de maio de 2021 de** <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>, 2018.

EXAME. Ranking traz as 400 maiores do agronegócio brasileiro. **Disponível em:** <<https://exame.abril.com.br/revista-exame/400-maiores-do-agronegocio/>>. **Acesso em: 3 jul. 2021.**, 2017.

HANSUPALAK, N. et al. Biogas reduces the carbon footprint of cassava starch: a comparative assessment with fuel oil. **Journal of Cleaner Production**, v. 134, p. 539–546, 2016.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. **Food Bioscience**, v. 5, p. 64–72, 2014a.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, v. 7, p. 31–36, 2014b.

HU, I. C. **Production of potential coproducts from microalgae, Biofuels from Algae** Elsevier, , 2019.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Obtido em:**

https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca/item/download/35935_814f9e52b5de282f4075947c071edda2#:~:text=A%20estimativa%20de%20produ%C3%A7%C3%A3o%20brasilei, v. Instituto, 2021.

INOUE, K. R. A. et al. Concentração de nutrientes em plantas de milho, adubadas com biofertilizantes, obtidos na digestão anaeróbia da manipueira. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.

IP, P.-F.; CHEN, F. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. **Process biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3491–3496, 2005.

JACQUES, R. A. et al. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: a comparison with maceration. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 14, n. 1, p. 6–12, 2007.

JOHNSON, E. A. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 169–174, 2003.

JUNIOR, J. C. S. et al. Queijo de porco como aproveitamento de subprodutos do abate de suínos: Uma revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 141–147, 2016.

KIKUKAWA, Hiroshi, et al. Efeito do etanol na produção de astaxantina e ácidos graxos na levedura vermelha *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132.3: 2034–2041

KOT, A. M. et al. Biodegradation of deproteinized potato wastewater and glycerol during cultivation of *Rhodotorula glutinis* yeast. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 428–432, 2015.

KOT, A. M. et al. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 6, p. 459–516, 2005.

KUNG, C.-C.; KONG, F.; CHOI, Y. Pyrolysis and biochar potential using crop residues and agricultural wastes in China. **Ecological Indicators**, v. 51, p. 139–145, 2015.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. [s.l.] Elsevier, 2011.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Viabilidade de uso da manipueira como substrato de processo biológico. I: Caracterização do substrato armazenado à temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Mandioca, Cruz das Almas**, v. 15, n. 1/2, p. 7–14, 1995.

LIONETTO, M. G. et al. Biomonitoring of water and soil quality: a case study of ecotoxicological methodology application to the assessment of reclaimed agroindustrial wastewaters used for irrigation. **Rendiconti Lincei**, v. 27, n. 1, p. 105–112, 2016.

LUENGO, E. et al. Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. **Separation and Purification Technology**, v. 136, p. 130–136, 2014.

LUQUE-GARCIA, J. L.; DE CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 928–935, 2010.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202–212, 2005.

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

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 27–32, 2009.

MANNAZZU, I. et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1665–1673, 2015.

MARKET, T. Beta--Carotene Market. **Transparent Market Research**, 2018.

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, v. 52, p. 1–15, 2016.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A.; CERTIK, M.; DVORAKOVA, T.; HARONIKOVA, A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, v. 95, p. 338–342, 2012.

MATA-GÓMEZ, L. C. MONTAÑEZ, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C. N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial cell factories*, v. 13, p. 12, 2014.

MAZURCZAK, P. et al. Utylizacja odpadów pochodzących z zakładów przemysłu spożywczego i paliwowego z wykorzystaniem lipolitycznych drożdży *Yarrowia lipolytica*. **Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych**, v. 588, 2017.

MENDES-PINTO, M. M. et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 1, p. 19–24, 2010.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2009.

MICHELON, M. et al. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2012.

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

MILLER, M. W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 286–291, 1976.

MOLINÉ, M. et al. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 3, p. 156–161, 2009.

MONKS, L. et al. Assessment of carotenoids recovery through cell rupture of *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using compressed fluids. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2353–2359, 2012.

MORENO, L. et al. Feasibility of a novel use for agroindustrial biogas. **Journal of Cleaner Production**, v. 144, p. 48–56, 2017.

NEVES, C. et al. Cassava processing wastewater as a platform for third generation biodiesel production. **Scientia Agricola**, v. 73, p. 412–416, 2016.

NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 206–212, 1998.

OLIVEIRA, J. F. DE et al. Chemical properties of soil fertirrigated with dairy and slaughterhouse wastewater. **Engenharia Agrícola**, v. 37, p. 1244–1253, 2017.

PACHIEGA, R. et al. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 1, p. 155–163, 2019.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 8, p. 1052–1073, 2011.

PARK, E.-K.; LEE, C.-G. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1024–1030, 2001.

PARK, P. K.; KIM, E. Y.; CHU, K. H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 2, p. 148–152, 2007.

PÉREZ, C. et al. Supercritical fluid extraction of grape seeds: extract chemical composition, antioxidant activity and inhibition of nitrite production in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. **Food & function**, v. 6, n. 8, p. 2607–2613, 2015.

PETRIK, S. et al. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. **Biochemical engineering journal**, v. 90, p. 307–315, 2014.

PINTO, P. H. M.; CAMILI, E. A.; CABELLO, C. Processo de flotação no tratamento da manipueira originada da fabricação de farinha de mandioca. **RETEC. Revista de Tecnologias**, p. 53–62, 2010.

PUPO, E.; GÓMEZ ROBLES, L.; CAMPAÑA MARRERO, IR Oxidative stress. **Medical Scientific Correspondence**, v. 21, no. 1, p. 171–186, 2017.

RAMMUNI, M. N. et al. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. **Food chemistry**, v. 277, p. 128–134, 2019.

RAO, A. R. et al. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from

microalgal biomass—A repeated dose study. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 711–717, 2013.

RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in applied microbiology**, v. 51, p. 1–52, 2002.

REBECCHI, S. et al. BIOMETHANE PRODUCTION FROM GRAPE POMACES: A TECHNICAL FEASIBILITY STUDY Extended abstract. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 12, n. S11, p. 105–108, 2013.

REED, G.; PEPPIER, H. J. Yeast technology. The AVI Publ. Co. **Inc. Westport Co**, p. 103–164, 1973.

RIBEIRO, J. E. S. Utilização de resíduos agroindustriais para a obtenção de moléculas bioativas a partir de microrganismos. 2018.

RIBEIRO, J. E. S. et al. Rhodotorula *glutinis* cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101419, 2019.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. [s.l.] CRC Press, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. [s.l.] International Food Policy Research Institute (IFPRI) Washington, 2004. v. 2

RYDER, G. **The United Nations world water development report, 2017: Wastewater: the untapped resource** UNESCO, , 2017.

SAENGE, C. et al. Potential use of oleaginous red yeast Rhodotorula *glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 210–218, 2011.

SANCHEZ CAMARGO, A. DEL P. Extração supercrítica de astaxantina e lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). 2010.

SCOPUS. <https://www.scopus.com/results/results.uri?sort=plf-TITLE-ABS-KEY+%28residues+industriais+%29&origin=resultslist&zone=leftSideBar&editSaveSearch=&txGid=2c5fbc58a8ebc0fb75d15b63ecabd445> (Acessado em 09 de agosto de 2021). 2021.

SEDMAN, J.J.; WEERASINGHE, D.K.; JOLLY, S.O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*, v. 4, p.107–112, 1990.

SERNA-LOAIZA, S. et al. Integral use of plants and their residues: the case of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) conversion through biorefineries at small scale. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 36, p. 35949–35959, 2018.

SHEKHAWAT, K. et al. RNA-seq based transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in mixed-culture fermentations under anaerobic conditions. **BMC genomics** , v. 20, no. 1, p. 1–15, 2019.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012.

SICARD, D.; LEGRAS, J.-L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes rendus biologies**, v. 334, n. 3, p. 229–236, 2011.

SILVA, J. et al. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. 2018.

SILVA, J. DA et al. Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, n. October, p. 101847, 2020.

SUBRAMANIAM, R. et al. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1271–1287, 2010.

SUMAN, P. A. et al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, p. 379–384, 2011.

SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. **The Journal of supercritical fluids**, v. 37, n. 3, p. 397–408, 2006.

TADDEO, R. et al. Nutrient management via struvite precipitation and recovery from various agroindustrial wastewaters: Process feasibility and struvite quality. **Journal of environmental management**, v. 212, p. 433–439, 2018.

TÖRNWALL, M. E. et al. Effect of α -tocopherol and β -carotene supplementation on coronary heart disease during the 6-year post-trial follow-up in the ATBC study. **European heart journal**, v. 25, n. 13, p. 1171–1178, 2004.

TORQUATO, L. D. M. et al. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. **Waste management**, v. 59, p. 181–193, 2017.

TSOLCHA, O. N. et al. Agroindustrial wastewater treatment with simultaneous biodiesel production in attached growth systems using a mixed microbial culture. **Water**, v. 10, n. 11, p. 1693, 2018.

URNAU, L. et al. Extraction of carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using ultrasound-assisted and chemical cell disruption methods. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 6, p. 1377–1381, 2018.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009.

VALDUGA, E. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 207–213, 2014.

VIÑARTA, S. C. et al. Oleaginous yeasts from Antarctica: screening and preliminary approach on lipid accumulation. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1360–1368, 2016.

WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p.

3307–3329, 2014.

WICHUK, K.; BRYNJÓLFSSON, S.; FU, W. Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae: Emerging technology and prospects. **Bioengineered**, v. 5, n. 3, p. 204–208, 2014.

YAÑEZ-OCAMPO, G. et al. Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas. **Open agriculture**, v. 2, n. 1, p. 341–349, 2017.

YUAN, J. et al. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 1, p. 150–165, 2011.

ZAGHDOUDI, K. et al. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Food chemistry**, v. 184, p. 131–139, 2015.

ARTIGO 1: PRODUCTION OF BIOMOLECULES THROUGH THE MICRO-ORGANISM *Rhodotorula glutinis* IN A BIOREACTOR USING CASSAVA WATER AS A CARBON SOURCE

ABSTRACT

Cassava wastewater is the residue from the production of cassava flour, improperly discarded it causes damage to the environment. Despite its toxicity, cassava wastewater has interesting physicochemical properties for the cultivation of microorganisms and production of different bioproducts such as betacarotene, which has antioxidant activities in addition to serving as a natural colorant. The biotechnological production of carotenoids is interesting due to the current concern with use of chemical additives in foods and cosmetics. Among betacarotene-producing microorganisms, the yeast *Rhodotorula glutinis* has advantages of having a high growth rate and producing significant amounts of carotenoids. The aim of this work was to evaluate the viability of using the cassava wastewater as substrate for the production of carotenoids, lipids and biomass in an integrated bioreactor. *R. glutinis* cells were initially cultivated in YMA medium and inoculated in a bioreactor containing 3 L of cassava wastewater diluted in autoclaved distilled water with 5 g/L of ammonium sulfate. The cultures were carried out in an integrated bioreactor programmed to maintain temperature at 25 °C under constant agitation of for 84 h; samples were collected for analysis of biomass, lipids and carotenoids. Regarding the results of cultivation in bioreactor, the maximum biomass produced was 8.81 g/L, 72 h after the inoculum, 0.81 g/L of lipids and 1.41 mg/L of carotenoids. The yeast *Rhodothorula glutinis* showed important growth when cultivated in a bioreactor in medium containing cassava wastewater as carbon source, producing important intracellular metabolites. These results support the feasibility of cassava wastewater as substrate used in biotechnological process with the aim of producing carotenoids and lipids.

Key-word: Carotenoids; Agro-industrial-waste; Biotechnology.

1 INTRODUCTION

Industrial waste disposal has become one of the reasons of environmental pollution and, as a result it has been one of the largest problems in the modern world, promoted by huge formation of waste. The management of that waste after its production has been a common problem that industry must deal with (Mazurczak et al., 2017). Biotechnology has presented many advances that offer several possibilities of use, including economic reasons, for agro-industrial residues, thus avoiding their accumulation and, therefore, helping to preservation of rivers, groundwater and soils (Stroparo, Beitel, Resende & Knob, 2012).

One way to solve this problem is to use these residues as a carbon source for biotechnological production, since they are generally rich in their composition. An example of this type of waste is the water from cassava pressing during the flour production (Suman et al. 2011).

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) has a tuberous root system responsible for storing its starch reserves. It is grown and consumed mainly on Africa, Asia and South America. Cassava production in Brazil in 2020 was estimated at around 19 million tons (IBGE 2021). The North and Northeast regions of Brazil are the main producers of cassava. These regions have thousands of flour houses destined to small productions (EMBRAPA, 2019). Considering the cassava has an average of 300 liters of cassava wastewater per ton of root (Chuzel, 2001), this residue cannot be neglected. Silva et al. (2018) used this residue as carbon source for microbial cultivation and interesting results were observed, such as the biosynthesis of lipids and carotenoids by the genus *Rhodotorula*.

Rhodotorula is a genus of unicellular yeasts, part of the phylum Basidiomycota, family Cryptococcaceae, subfamily Rhodotorulodae and has reddish pigmentation (Tang et al., 2019). It can be found in different sources, such as fruits, soil and in the sea (Kurtzman et al., 2011). Nowadays, due to natural production capacity of this genus, in addition to the production of lipids, it also has ability to produce several industrial target components and, therefore, there are many researches on this genus. Nevertheless, the genus *Rhodotorula* also produces carotenoids, enzymes and terpenes (Park et al., 2017). Several yeasts of *Rhodotorula* genus have been classified as oilseeds, as they can accumulate between 40-70% (w/w) of intracellular lipids (Viñarta et al., 2016). There are many factors that have effect on the amount of lipids and carotenoids produced during fermentation, such as: composition of the medium, environmental factors including aeration, pH, temperature, size of the inoculum and incubation period. The most determining factor in production of biomolecules is the used microorganism

(Subramaniam et al., 2010).

It was observed that produced lipids by *Rhodotorula glutinis* can be used like raw matter in food industry and in animal feed industry. They can also be used as important source of fatty acids (Ribeiro et al, 2019). The yeast *R. glutinis* has been extensively studied because of its great production capacity for both β -carotene and lipids. In addition, this yeast has a high growth rate and is well adapted to using various low-cost agricultural raw materials as a carbon source, thus demonstrating great potential for industrial applications. Carotenoids are natural dyes and have an important role as antioxidants, thus acting in health promotion and, for this reason, there is a growing interest in methods of obtaining these compounds.

An alternative currently used in the production of carotenoids and lipids is cultivation in an integrated bioreactor, mainly due to its ability to optimize the process, its power to control variables and its safety. Since these compounds can be used in different areas, such as food, cosmetics, pharmaceuticals and feed.

2. Material and methods

2.1. Treatment and characterization of substrate

The assays were carried out in Bioengineering Laboratory at Federal University of Paraíba (UFPB), in the city of João Pessoa. Cassava wastewater used in this research was collected from the flour mill called “Folha Verde”, at city of Sobrado (07° 08’ 43” S, 35° 14’ 11” O) Paraíba, Brazil. Cassava wastewater was collected, *in loco*, in the processing of production of cassava flour, right after pressing the crushed cassava.

The use of cassava wastewater, in the assays, was preceded by a pre-treatment being heated at 100 °C for 20 min, after cooled and centrifuged at 1182 *g* for 5 min. Then, the supernatant was collected and the solid residue remaining was discarded. Finally, supernatant was then diluted with distilled water until reaching the concentration of reducing sugars 10 g/L standard to start all the assays (RIBEIRO et al., 2019)).

2.2. Microorganism

The yeast *Rhodotorula glutinis* (CCT 2182), was obtained from culture collection of the André Tosello Foundation (Campinas, São Paulo, Brazil) and was stored in the Biotechnological Processes Laboratory of the Technology Center (CT) of the Federal University of Paraíba (UFPB). The cells of *R. glutinis*, obtained in lyophilized form, were hydrated for 10 days at 30 °C, in YM medium, containing: 3 g/L of yeast extract, 3 g/L of malt

extract, 5 g/L of peptone and 10.0 g/L of glucose. After, cells were transferred with a sterile loop to Petri dishes containing YM medium with 2% bacteriological agar (YMA medium). The plates were incubated upside down at 30 °C for 48 hours and stored in refrigeration at 5 °C (RIBEIRO et al., 2019).

2.3. Inoculum

Pre-cultures were transferred to 300 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium (YM medium): glucose (10 g/L), peptone (5 g/L), yeast extract (3 g/L) and malt extract (3 g/L). The cells were incubated at 30 °C on an orbital shaker at 3 g for 24h. Subsequently, yeast cells were collected by centrifugation at 1182 g for 5 min. Cells were suspended in sterile distilled water until cell concentration of 10^9 cells/mL. The cell quantitation was determined using a Neubauer with 1% mm deep counting chamber under the light microscope field.

2.4. Scale up in Bioreactor

Based on the work of Ribeiro et al. (2019) in bench scale using 200 mL Erlenmeyer, the scale-up was studied experimentally from 0.2 L to 3 L (15 times). For this study, Tecnal Tec-Bio-V 4.5L bioreactor (maximum volume) was used. To seek optimization of the scale-up process, the parameters studied by Ribeiro et al. (2019) were used as a standard (central point) and extended to higher and lower values of these parameters, using the factorial planning methodology and response surface. Supplementation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source at a concentration of 5 g/L at the beginning of fermentation, temperature 25 °C, pH 7.0 and stirring speed of 3 g were performed. Cultivations were performed in triplicate.

2.5. Analytical methods for evaluating microbial kinetics

Biomass

Microbial kinetics were analyzed using 2 mL aliquots and collected during time intervals of 0, 12, 24, 36, 48, 72, 84 and 96 hours. The samples were centrifuged at 11200 g for 3 min, cell concentration was determined spectrophotometrically (U2M Quimis model spectrophotometer) at wavelength of 600 nm. To quantify cell concentration in the medium, a standard curve with optical density values as a function of dry biomass concentration was used. The medium without the cells, and at the same dilution as the medium samples.

Reducing sugars (RS)

A modification of DNS method (Miller, 1959) was used. 0.5 mL of the sample and 0.5 ml of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) solution were used, and it was incubated for 5 minutes at 100 °C. The reaction was cooled with an ice bath and concentration was determined spectrophotometrically at 540 nm.

Extraction and quantification of carotenoids

Extraction and quantification of carotenoids were performed 96 h after inoculation. Samples of 5 mL were collected, then the aliquot was transferred to a 50 mL Falcon tube. After, the solution was centrifugated and the supernatant was discarded, then 2 ml of dimethylsulfoxide at 60 °C and 0.5 g of glass beads were added. The solution was vortexed for 2 min. Then, the system was incubated at 60 °C for 15 min. After this incubation period, 2 mL of petroleum ether and 2 mL of Acetone were added and another shaking was performed for 2 min. Finally, 2 mL of 20% NaCl solution (w/v) were added and vortexed for 1 min. The final solution was then centrifuged at 1452 *g* for 10 min. 3 mL of the supernatant were removed and read in a spectrophotometer (450 nm). The absorbance was then converted into concentration using Eq. 1 (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

$$\text{Total Carotenoids} = \frac{A \times V \times 104}{a \times m} \quad (\text{Eq1})$$

Where:

[*Total Carotenoids*]: concentration of total carotenoids in µg/g of cell;

A: absorbance at 450 nm;

V : sample extract volume;

a : molar absorptivity of the chemical species (carotenoids = 2592);

m : sample mass.

Total Lipids

Determination of total lipids was performed according to the Bligh method; Dyer (1959). The cells were centrifuged 1182 g for 5 min, dried in an oven at 105 °C for 24 h, and then crushed and ground in a mortar to obtain a fine powder. Cell disruption was performed by acid hydrolysis and, therefore, 5 mL of 2N HCl was added to 200 mg of the dry sample and incubated in a water bath at 80 °C (model 105 Di-F, Delta) for 1 h. The lipids were extracted with 11.6 ml of a mixture of chloroform: methanol: distilled water (1:1:0.9). Transesterification into FAMES (fatty acid methyl esters) was performed according to the methodology proposed by Hartman and Lago (1973). FAMES were analyzed using a GC-FID (Trace™ 1310, Thermo Fisher Scientific, USA) equipped with a SP™-2380 capillary column (60 m x 0.25 mm inner diameter and 0.25 µm film thickness). Different peaks were identified by comparison with a FAME standard (Supelco® 37 Component FAME Mix, USA), quantified and normalized according to their respective peak areas.

Yield and productivity

The conversion factors were calculated according to the quantify of carotenoids produced per unit mass of consumed substrate ($Y_{p/s}$), the amount of biomass produced per unit mass of consumed substrate ($Y_{x/s}$) and the quantify of carotenoids produced per cell dry mass unit ($Y_{p/x}$) as well as carbon source (Q_s), cell productivity (Q_x) and carotenoids (Q_p) were determined in different runs. The total production of lipids (g/L) was found at the end of the process after 96 hours of cultivation.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physical Chemical characteristics of cassava wastewater

The data on the composition of substrate used confirm cassava wastewater as an important carbon source to be used in biotechnological processes. Cassava wastewater has high

concentrations of reducing sugars, in addition to 1.58% of protein, which is important for the development of microorganisms (Table 1). The value of total sugar found (47.18 g/L) is 18.80% lower than those found by Ribeiro et al. (2019), which was 58.11 g/L, however it was very close to the value found by Silva et. al. (2018) who found 50.60 g/L and achieved excellent results in production of carotenoids, lipids and biomass through the yeasts *Rhodothorula glutinis* and *R. mucilaginosa*, respectively. This difference in total sugars was due to the difference in harvest between cassava and, consequently, in the content of reducing sugars in cassava.

The value found for free cyanide (3.0 mg/L) was low when compared to those previously reported in literature (Leonel and Cereda, 1995). Furthermore, Souza et al. (2014) also found considerably low values of free cyanide, ranging from 5.30 to 16.60 mg/L. These values differ, as the cassava plant used by the authors was collected in cassava flour houses located in the semiarid region of the state of Alagoas (Northeast, Brazil), a region with a more arid climate than the climate of the cassava grown and used in our samples. The concentration of free cyanide in CW depends on the plant genotype, cultivation and processing, storage conditions and time (Leonel and Cereda, 1995). All values found are far below the limit values considered for human consumption, of 50 mg/kg of cassava (Bolhuis, 1954) or 36 mg/L of cassava wastewater (Araújo et al. 2014). Therefore, all our runs were carried out with innocuous levels of cyanide concentration. Another interesting factor of cassava wastewater was the pH value of the medium. The pH of the cassava wastewater used in all assays was 7.0, a condition previously studied by our research group and reported by Zhang et al., 2019. This is an optimal value for a culture medium intended for the cultivation of yeasts (Aksu and Eren, 2007). The pH value (5.3) found in cassava wastewater is interesting to keep it in stock, as it inhibits microbial growth. The pH adjustment (to 7.0) was only carried out later, at the time of cultivation. This factor is important for future scale-up of the process, since the storage and transport of the cassava wastewater can be carried out more easily at the initial pH value.

Table 1: Composition of cassava wastewater used in this work.

Parameter	Value	Silva (2018)
Moisture (% w/w)	93.54 ± 0.35	92,38
Proteins (% w/w)	1.58 ± 0.03	1,17
Reducing sugars (g/L)	32.24 ± 0.66	30,20
Non-reducing sugars (g/L)	14.93 ± 1.15	20,40
Total sugars (g/L)	47.18 ± 1.91	50,60
Ashes (% w/w)	1.00 ± 0.30	0,54
Total soluble solids (°Brix)	7.30 ± 0.21	7,0
pH	5.3 ± 0.03	5,26
Especific mass (g/L)	1097.12 ± 0.8	-

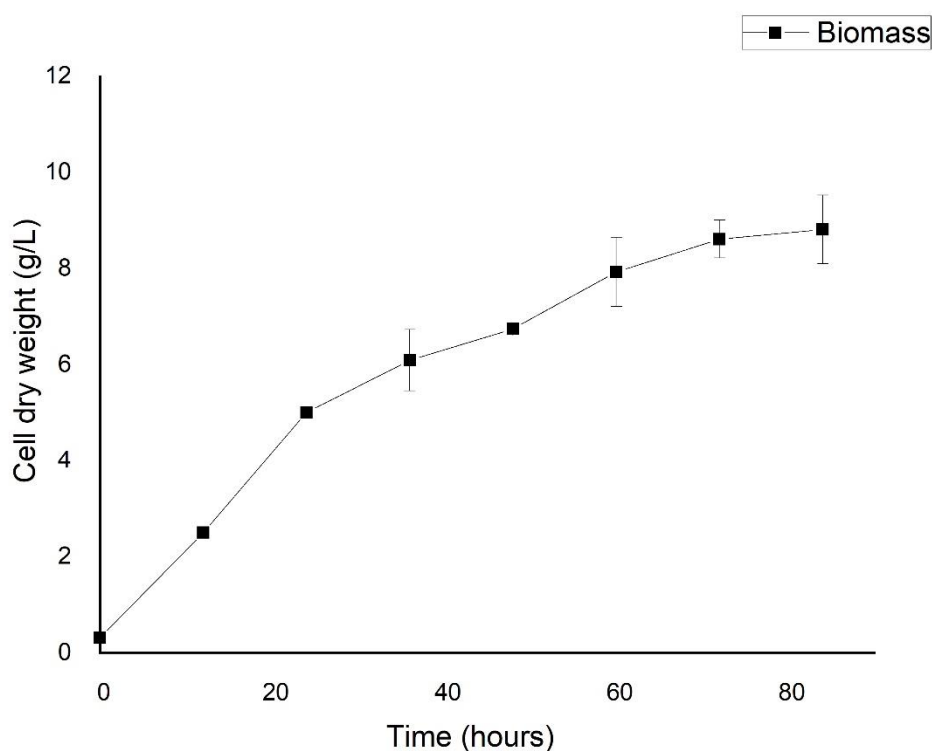
3.2 Biomass production

The maximum growth of biomass (8.81 g/L) was reached in the 60th hour after the start of cultivation (Fig. 1), using the cassava wastewater diluted in distilled water until reaching a concentration of 10 g/L of RS, pH adjusted to 7.0 and supplementation of 5 g/L of ammonium sulfate in the bioreactor. Biomass production reached rapid growth in first 24 hours, possibly due to the availability of sugar throughout the entire cultivation period (Fig. 2). It is noteworthy that when analyzing the curve, it can be seen that the lag phase was very short (before 12 h) which confirms the efficiency of the bioreactor for cultivation. The growth of *R. glutinis* can be influenced by several factors, such as the quality and quantity of carbon and nitrogen sources, stress, agitation, minerals, vitamins and temperature (Hernández-Almanza et al., 2014; Yen et al., 2012). The cassava wastewater used in these assays only needed ammonium sulfate supplementation in order to maintain suitable C/N ratio, showing how cassava wastewater is a substrate with potential. As is known, biomass growth of *R. glutinis* is almost unaffected by high C/N ratios (Vinarta et al., 2020; Elfeky et al., 2019; Zhang et al., 2019). Thus, ammonium sulfate supplementation was performed to maintain the intracellular carbon flux within the studied concentration range.

The biomass data found in this work were very similar to other studies that cultivated *R. glutinis* using different culture media. Yen et al. (2015) used crude glycerol and observed a growth of 11.7 g/L of biomass. Liu et al. (2015) studied the increasing of lipid production using corn cob hydrolysate, the authors achieved the production of 15.1 g/L of cell biomass. Tinoi et al. (2016) used pineapple husk residue, obtained 15.2 g/L of biomass. Xueling et al. (2018) used

wastewater from ethanol production and achieved a maximum biomass production of 11.31 g/L and Zhiping et al. (2014) increased biomass production and achieved 10.3 g/L. It is important to emphasize that all these studies mentioned were carried out using *R. glutinis* cultivated in a bioreactor, and therefore, the biomass production found in this work can be considered satisfactory. Another point to emphasize is the versatility of this yeast in being cultivated using alternative substrates.

Figure 1: Growth curve for *R. glutinis* in the described bioreactor over 84 hours.

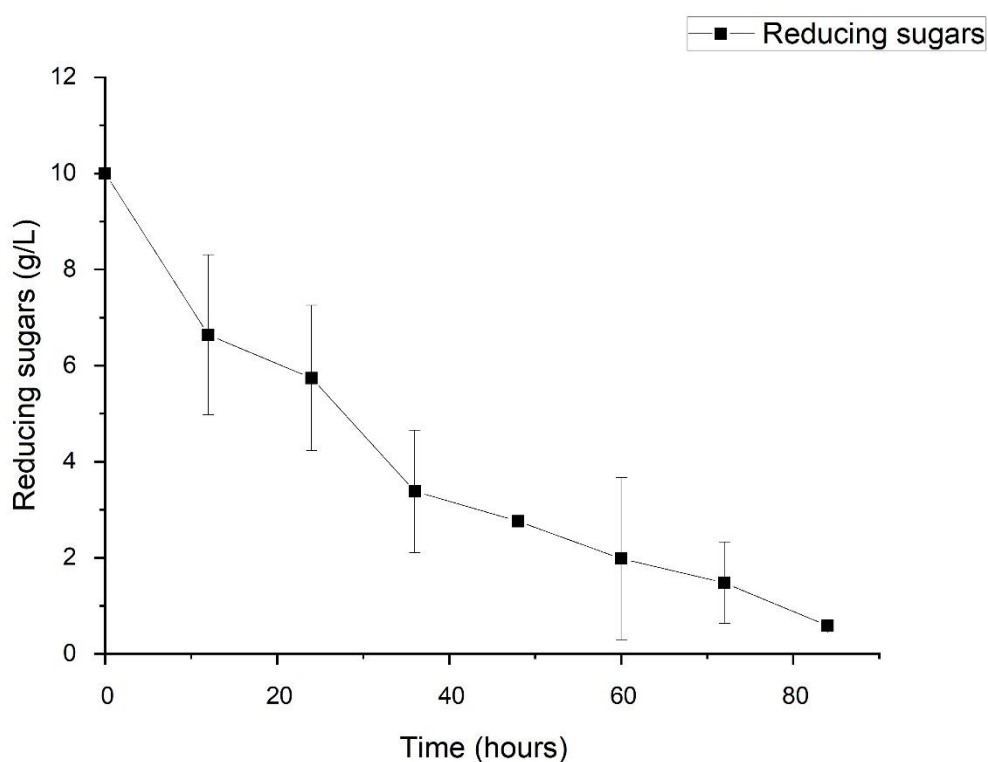


3.3 Consumption of reducing sugars

The cell growth obtained by fermentation with cassava wastewater showed that this by-product is efficient in terms of its ability to supply carbon in maintaining the cellular development of yeasts. Cassava wastewater has a sugar profile reported in the literature of dextrin (2.6%), maltose (1.4%), sucrose (32.1%), glucose (38.3%) and fructose (25.6%) (Damasceno et al., 2003). The values of reducing sugars (RS) were adjusted to 10 g/L in all assays (figure2). This standardization was carried out to always maintain the same initial

concentration and ensure that sugar inhibition effects could be neglected. It can be observed that 24 hours after the beginning of the fermentation process, the reducing sugars suffered a significant decrease to 4.25 g/L, thus explaining the high growth rate in this period. It was observed that 85% of the RS was consumed at the end of cultivation

Figure 2: Values of reducing sugar over 84 hours of cultivation.

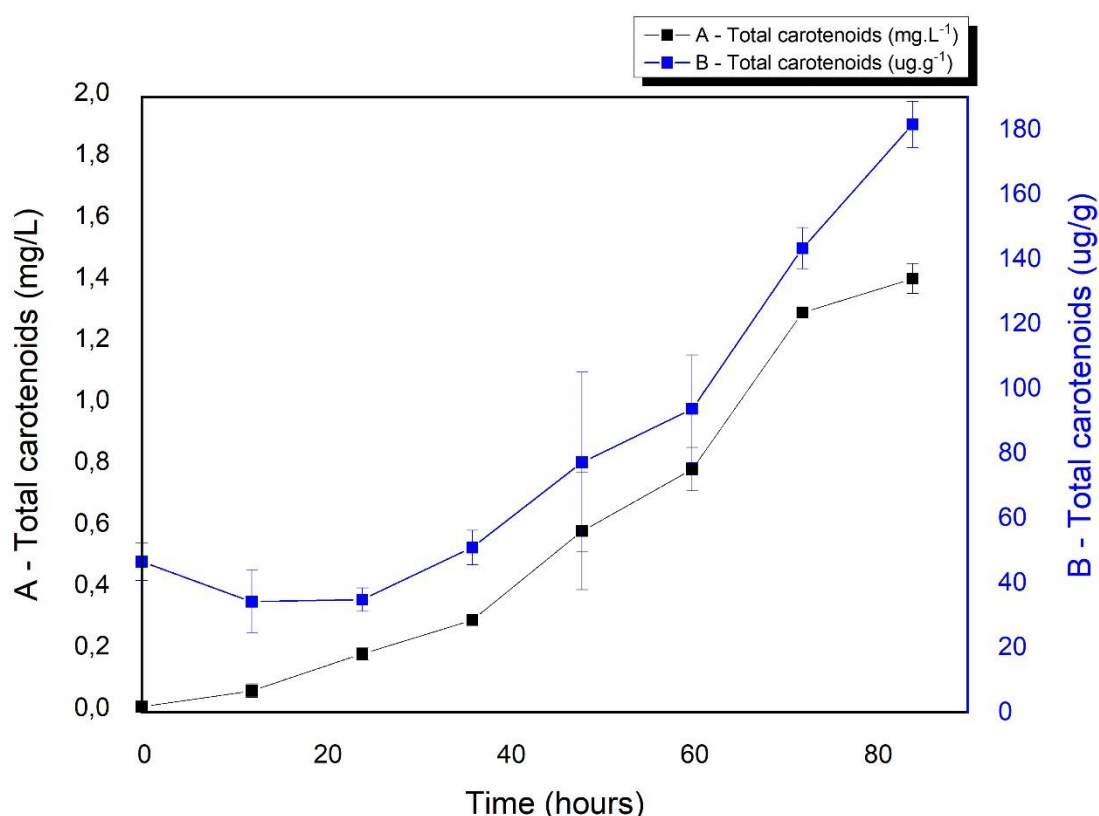


3.4 Carotenoid production

The transformation of waste such as cassava wastewater into carotenoids by *R. glutinis* is important for its treatment and valorization. Carotenoids are widely used in industry, whether in food, supplementation in diets or in cosmetics and are still important as a raw material for supplementation in feed for poultry, fish and mollusks (Kot et al., 2018). Microbial production of carotenoids is intracellular and, like other intracellular bioproducts, after fermentation a number of processes are important for biomolecule recovery and processing (Cardoso et al. 2017a, 2017b). The quantity of extracted carotenoids and its relationship with the production

per unit of biomass and unit of cassava wastewater are shown in Figure 3A highest production of carotenoids (1.41 mg/L) was achieved at the end of the fermentation process (84 h). It can also be observed that after 72 hours the concentration of carotenoids remains almost constant. This production of carotenoids shows the yield of carotenoids for each liter of used cassava wastewater. Figure 3B, on the other hand, shows an indication of yield of carotenoids in relation to biomass production achieved in the assays.

Figure 3: Production of carotenoids by *R. glutinis* over 84 hours of cultivation.



It is possible to state this production of carotenoids in bioreactor using cassava wastewater with an initial concentration of reducing sugar of 10 g/L is directly linked to the limitation of nutrients, which in turn causes an oxidative response of yeast cells during fermentation (Petti et al., 2011). Studies performed by Han et al. (2005) demonstrated that cells are sensitive to essential amino acid depletion because they cause cellular stress. This lack of nutrients caused an increase in the load of metabolized carotenoids. In yeasts, the most important role of carotenoids is to deactivate free radicals that are normally produced by cells in their metabolism, for example, oxygen singlets ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radicals ($^{\cdot}\text{OH}$) peroxides and

other oxidants (Berera et al., 2010). When fermentation takes place in unfavorable media, as in this study, the stress suffered by *R. glutinis* is greater, thus causing a response, increasing the activity of its enzymes and, therefore, carotenogenesis.

3.4 Fatty acids and Lipids production

Another interesting product to analyze is quantity of lipids produced by *R. glutinis* under these conditions studied. Yeast synthesized intracellular lipids, and the lipid content after cultivation in the bioreactor was 0.81 ± 0.099 g/L. This result was 43% higher than that found by Silva (2020). In addition, the present study achieved greater production of carotenoids and this fact is due to the use of operating conditions used in the bioreactor. These conditions were studied previously by our group. This result of greater amounts of lipids is promising when there is an interest in using this product as feed, since the amount of lipids is an important factor for fattening animals. The operating conditions of T 25 °C, pH 7.0 and stirring speed of 3g previously tested on a bench scale, were confirmed and the production of biomolecules reached even higher results when the tests were carried out on a larger scale, in the bioreactor.

It is known that lipid profile of microbial metabolites is directly dependent on the carbon source used during fermentation (Yen et al., 2012). The yeast *R. glutinis* is classified as oleaginous microorganisms, that is, they are defined as those that have capacity to produce and accumulate more than 20% of lipids in their dry biomass (Ratledge and Cohen 2008). *R. glutinis* can be cultivated in cassava wastewater, thus it can be suggested that this waste can be used efficiently as substrate in cultivation for industry.

The composition of the main fatty acids analyzed is described in Table 2. With values of 68.85% in the fermentation with *R. glutinis*, oleic acid (C 18:1 n9 cis) was the main fatty acid found, followed by palmitic acid (C 16:0) where 16.6%, stearic acid (C 18:0) 5.75% and linoleic acid (C18:2 n6 cis) with the concentration of C18:2 n6 cis were found. According to the literature (Yen et al., 2012; Kot et al., 2019b), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2) and linolenic acid (C18:3) account for more than 80% of the total fatty acids in *R. glutinis* lipids.

Table 2: Composition of fatty acids produced during each fermentation

Fatty Acid ^a	Concentration ^b
C14:0	0,75 +- 0,09
C16:0	16,6 +- 0,07
C16:1 n7	1,26 +- 0,06
C17:0	0
C17:1 n10	0
C18:0	5,75 +- 0,28
C18:1 n9 cis	68,85 +- 0,24
C18:2 n6 cis	4,1 +- 0,28
C18:3 n3	0,25 +- 0,01
C20:1 n9	0,34 +- 0,02
C20:4 n6	0
C21:0	0,7 +- 0,08
C22:0	0,37 +- 0,08
C23:0	0
C24:0	1,02 +- 0,01

^a C14:0, myristic acid; C16:0, palmitic acid; C16:1 n7, palmitoleic acid; C17:0, heptadecanoic acid; C17:1 n10, cis 10 heptadecanoic acid; C18:0, stearic acid; C18:1 n9 cis, oleic acid; C18: 2 n6 cis, linoleic acid; C18:3 n3, linolenic acid ω -3; C20:1 n9, gondoic acid; C20:4 n6, arachidonic acid; C21:0, heneicosanoic acid; C22:0, behenic acid; C23:0, tricosanoic acid; C24:0, lignoceric acid.

^b Data represent the mean $\pm$ standard deviation (n = 3)

The analysis of biomass production per unit of mass of consumed substrate ($Y_{x/s}$) achieved 0.94 g/g; on the other hand, carotenoid produced per unit of dry mass of cells ($Y_{p/x}$) was 0.16 mg/g and carotenoid produced per unit of mass of consumed substrate ($Y_{p/s}$) was 0.15 mg/g. The carbon source consumption rate (Q_s) was 0.15 g/L/h; cell productivity (Q_x) was 0.14 g/L/h and carotenoid productivity (Q_p) 0.02 g/L/h. These results proved to be promising when compared to the values found by Ribeiro et al. (2019), who found values of Q_s 0.09; Q_x 0.048 and Q_p 0.008 g/L/h, respectively. Our values showed the versatility of this yeast when adapting to the growing conditions with the cassava wastewater inside a bioreactor.

Table 3: Productivity of experiments in bioreactor using cassava water as a carbon source.

Where: ($Y_{x/s}$) biomass produced per unit weight of substrate consumed; ($Y_{p/x}$) amount of carotenoids produced per unit dry weight of cells; ($Y_{p/s}$) amount of

	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$	$Y_{p/s}$	Q_x	Q_p	Q_s
	(g/g)	(mg/g)	(mg/g)	(g/L/h)	(g/L/h)	(g/L/h)
Productivity	0.89	0.15	0.13	0.12	0.017	0.13

carotenoids produced per unit weight of substrate consumed; (Q_s) rate of consumption of carbon source; (Q_x) cell productivity; (Q_p) productivity of carotenoids.

4 Conclusion

R. glutinis showed important growth when cultivated in bioreactor in a medium containing cassava wastewater as carbon source, producing important intracellular metabolites such as carotenoids (1.41 mg/L and 181,6 ug/g) and lipids (0.81 g/L and 9.56 g/100g). The operating conditions of T 25 °C, and stirring speed of 3 g tested in the bioreactor were confirmed and showed results even better to those found in bench assays. These results support the feasibility of using cassava wastewater as a substrate to be used in biotechnological process with the aiming of producing carotenoids and lipids in bioreactor.

REFERENCES

- Aksu, Z., Eren, A.T., 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochem. Eng. J.* 35, 107–113.
- Araújo, et al. 2014
- Berera, R., 2010. The light-harvesting function of carotenoids in the cyanobacterial stress-inducible IsiA complex. *Chem. Phys.* 373, 65–70.
- 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.
- BOLHUIS, G. G. The toxicity of cassava roots. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, Wageningen, v. 2, n. 3, p. 176-185, 1954.
- Cardoso LAC, Jäckel S, Karp SG, Framboisier X, Chevalot I, Marc I(2016) Melhoria de carotenóides *Sporobolomyces ruberrimus* produção pelo uso de glicerol bruto. *Bioresour Technol* 200:374–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.108>
- Cardoso LAC, Kanno KYF, Karp SG (2017a) Produção microbiana de carotenóides uma revisão. *Afr J Biotechnol* 16 (4): 139–146. <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15763>.
- Cardoso LAC, Karp SG, Vendruscolo F, Kanno KY, Zoz LI, Carvalho JC(2017b) Produção biotecnológica de carotenóides e seus aplicativos cátions em alimentos e produtos farmacêuticos. In: *Carotenoides*. InTech Open, London. <https://doi.org/10.5772/67725>.
- Chuzel, G. (2001). A indústria de processamento de mandioca em Brasil: técnicas tradicionais, tecnológicas desenvolvimentos, inovações e novos mercados. *africano Journal of Food and Nutritional Security* , 1 (1), 46-59. doi:10.4314 / fns.v1i1.19233.
- Cutzu, R., Coi, A., Rosso, F., Lina, L., 2013. A partir de glicerol em bruto de carotenóides por Utilizan gum mutante de *Rhodotorula glutinis* . *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1009–1017

- Damasceno, S., Cereda, M.P., Pastore, G.M., Oliveira, J.G., 2003. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. *Process Biochem.* 39, 411–414.
- Han JR, Zhao WJ, Gao YY, Yuan JM (2005) Efeito do estresse oxidativo e β -caroteno exógeno na diferenciação esclerótica e carotenóide produção de *Penicillium* sp. PT95. *Lett Appl Microbiol* 40: 412–417.
- Hartman, L., & Lago, RC (1973). Preparação rápida de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de lipídios. *Prática de laboratório*, 22 (6), 475.
- Hernández-Almanza, A., Montañez-Sáenz, J., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, CN, 2014. Produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* YB-252 em sólido -fermentação do estado. *Food Biosci* 7, 31–36.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, 2017. Obtido em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2017/lspa_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2017/lspa_201701.pdf).
- Jidapha Tinoi, Nuansri Rakariyatham, Optimization of pineapple pulp residue hydrolysis for lipid production by *Rhodotorula glutinis* TISTR5159 using as biodiesel feedstock, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 80, Issue 8, 2 August 2016, Pages 1641–1649, <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1177444>.
- Kot, AM, Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., Brys, J., 2018. Torulene e dtorularhodin: “novos” carotenóides fúngicos para a indústria? *Microb. Fábricas de células* 17, 1-14.
- Kot, Anna M., et al. "Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35.10 (2019): 1-10.
- Kurtzman, C., Fell, JW, Boekhout, T., 2011. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. Elsevier.
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F., 2007. Cultivo de alta densidade de levedura oleaginosa *Rhodospiridium toruloides* Y4 em cultura descontínua. *Enzyme Microb. Technol.* 41,312-317.
- Leonel, M., Cereda, M.P., 1995. Viabilidade de uso da manipueira como substrato de processo biológico. *Rev. Bras. Mandioca.* 15, 7–14.
- Liu Y, Wang Y, Liu H, Zhang J. Enhanced lipid production with undetoxified corn cob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour Technol.* 2015 Mar;180:32-9. doi: 10.1016/j.biortech.2014.12.093. Epub 2015 Jan 2. PMID: 25585258.
- Mazurczak, P., Zieniuk, B., Fabiszewska, A., Nowacka, D., Wołoszynowska, M., Białecka -Florjańczyk, E., 2017. Utylizacja odpadów pochodzących z zakładów przemysł uspożywczego i paliwowego z wykorzystaniem lipolitycznych drożdży *Yarrowialipolytica*. *ZPPNR* 588, 15-24.
- Miller, GL, 1959. Uso de reagente de ácido dinitrosalicílico para determinação de reducin gacúcar. *Anal. Chem.* 3, 426–428
- Park, Y.-K., Nicaud, J.-M., Ledesma-Amaro, R., 2017. O potencial de engenharia de *Rhodospiridium toruloides* como um burro de carga para aplicações biotecnológicas. *Tendências Biotechnol.* 36.
- Petti, A.A., Crutchfield, C.A., Rabinowitz, J.D., Botstein, D., 2011. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and no respiratory mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1089–1098.

- Ratledge C, Cohen Z (2008) Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol* 20:155–160. doi:10.1002/lite.200800044.
- Ribeiro, J. E. S. Utilização de resíduos agroindustriais para a obtenção de bioativos a partir dos microrganismos *Rhodotorula glutinis* e *Chorella protothecoides*. 2018. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba.
- Ribeiro, J. E. S., da Silva Sant'Ana, A. M., Martini, M., Sorce, C., Andreucci, A., de Melo, D. J. N., & da Silva, F. L. H. (2019). *Rhodotorula glutinis* cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101419.
- Rodrigues, M. I.; IEMMA, A. F. *Experimental Design and Process Optimization*. 1st. ed. CRC Press, Boca Raton, p. 336 2014.
- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas [SEBRAE]. (2012). Mandioca (farinha e fécula) – Série Estudos Mercadológicos . Obtido em 22 de março de 2018 de [www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS / bds / bds.nsf / 5936f2d444ba1079c3aca02800150259 / \\$ File / 4247.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/5936f2d444ba1079c3aca02800150259/$File/4247.pdf)
- SILVA, Josevan da et al. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, 2018.
- Souza, S.O., Oliveira, L.C., Cavagis, A.D.M., Botero, W.G., 2014. Cyanogenic residues: environmental impacts, complexation with humic substances, and possible application as biofertilizer. *Water Air Soil Pollut.* 225, 2223–2228.
- Stroparo, EC, Beitel, SM, de Resende, JTV, & Knob, A. (2012). Seleção de fungos filamentosos e deresíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias* ,33 (6), 2267-2278. doi: 10.5433 / 1679-0359.2012v33n6p2267
- Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M., Bajpai, R., 2010. Microbial lipids from rerecursos novos: produção e caracterização. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*37, 1271–1287.
- Suman, PA, Urbano, LH, Leonel, M., Mischán, MM, 2011. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). *Acta Scientiarum. Technology*, 33, 379-384.
- Viñarta, SC, Angelicola, MV, Barros, JM, Fernández, PM, Mac Cormak, W., Aybar, MJ, de Figueroa, LIC, 2016. Leveduras oleaginosas da Antártica: triagem e abordagem preliminar sobre o acúmulo de lipídios. *J. Basic Microbiol.* 56, 1360–1368.
- Xueling Zhang, Meng Liu, Xu Zhang, Tianwei Tan, Microbial lipid production and organic matters removal from cellulosic ethanol wastewater through coupling oleaginous yeasts and activated sludge biological method, *Bioresource Technology*, Volume 267, 2018, Pages 395-400, ISSN 0960-8524, doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.075.
- Yen HW, Yang YC, Yu YH (2012) Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *J Biosci Bioeng* 114:453–456. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.04.022.
- Yen, HW., Liao, YT. & Liu, Y.X. The growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an airlift bioreactor on crude glycerol through a non-sterile fermentation process. *Bioprocess Biosyst Eng* 38, 1541–1546 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1396-5>
- Zhiping Zhang, Hairui Ji, Guiping Gong, Xu Zhang, Tianwei Tan, Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for

enhancement of biomass and lipid yields, Bioresource Technology, Volume 164, 2014, Pages 93-99, ISSN 0960-8524, doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.039.

ARTIGO2: PRODUCTION OF LIPIDS AND CAROTENOIDS FROM *Rhodotorula glutinis* AND *Paffia rhodozyma* USING CASSAVA WASTEWATER AS A CARBON SOURCE

ABSTRACT

Many efforts have been made to develop technologies that optimize the production of biomolecules by microorganisms, and thus, the use of integrated bioreactors and the use of waste is also quite convenient. In this study, microorganisms *Paffia rhodozyma* and *Rhodotorula glutinis* were used because they have a high growth rate, producing significant amounts of intracellular carotenoids. Therefore, this work aimed to compare three fermentation conditions (two individual cultures and another culture using two yeasts concomitantly) in a bioreactor, to evaluate the viability of cassava wastewater as a substrate for production of carotenoids, lipids and biomass. In addition to comparing and determining the effect of stress caused by mixed fermentation on production of biomolecules. Biomass, lipids and carotenoids produced were analyzed. The physicochemical analysis of cassava wastewater were carried out and it were found: 93.54% of moisture; 32.24 g/L of reducing sugars; 47.18 g/L of total sugars; 1.58% protein; 1% ash; total soluble solids of 7.3° Brix and pH 5.3. The best results were found during consortium cultivation, where 7.74 g/L of biomass, 6.04 g/L of lipids and 1.68 mg/L of carotenoids were produced. Yeasts showed remarkable growth when cultivated in bioreactor in medium using cassava wastewater. Therefore, the use of cassava wastewater as substrate in biotechnological process with purpose of producing carotenoids and lipids proved to be feasible.

1. INTRODUCTION

Currently, application of microorganisms and biotechnological techniques aiming at the synthesis of products of scientific interest that help in health and in increasing the quality of life have been widely studied. Thus, searching for greater technical feasibility that enables large-scale applicability is of global concern. One of the problems faced by industry has been the financial cost that often makes this production unfeasible. Therefore, the use of agro-industrial residues as carbon source for production of biocompounds is welcome (MAZURCZAK et al., 2017; STROPARO et al., 2012).

Regarding use of microorganisms as bioproducing agents, the main problem is the use of substrates that have minimum conditions that allow their growth and can thus be used by the industry (SUMAN et al., 2011). A promising substrate, cassava wastewater is a residue from the production of flour from processing of cassava wastewater. Often cassava wastewater is illegally discarded by the flour house in open-air lakes, making it impossible to legalize production, since the cost of proper disposal of this waste is high for these small producers.

Therefore, cassava wastewater has been studied as a culture medium for production of biomolecules on a small scale, and thus, enable a profitable destination for these producing communities (RIBEIRO et al., 2019).

The North and Northeast regions in Brazil are the main producers of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), with thousands of flour houses used for small productions (EMBRAPA, 2018). Cassava has a tuberous root system responsible for the storage of its starch reserves, it is cultivated and consumed mainly in the continents of Africa, Asia and South America. Cassava production in Brazil was estimated at around 19 million tons in 2020 (IBGE, 2021). The greatest economic part in the plant is its root, where starch accumulates, which can be transformed into flour. These processes, however, generate an average of 300 liters of cassava wastewater per ton of cassava (CHUZEL, 2001). Thus, several researches investigate the reuse of this residue as a carbon source for microbial cultivation. Interesting results have already been obtained, such as the biosynthesis of lipids and carotenoids by red yeasts. Among these yeasts, there are two that stand out: *Rhodotorula glutinis* and *Paffia rhodozyma* (Silva et al. 2018).

The yeast *P. rhodozyma* is important in production of carotenoids due to its easeness of using different sources of carbon as a substrate, having fast metabolism, rapid growth rate and colonies reaching high population density and also for having received the title of GRAS. (generally recognized as safe), that is, it is recognized as safe and can be used by food industry. The genus *Rhodotorula* is currently studied in several biotechnological applications aiming at production of several industrial compounds. In addition, the genus *Rhodotorula* also produces carotenoids, enzymes and terpenes (PARK; NICAUD; RODRIGO, 2018). Several yeasts of *Rhodotorula* genus (including *glutinis* subtype) were classified as oilseeds, as they are able to accumulate between 40-70% of their weight in intracellular lipids (VIÑARTA et al., 2016).

Both inoculum size and operational factors including temperature, pH, aeration, and medium composition can interfere with lipid and carotenoid content at the time of fermentation, however the most determining factor in production of biocompounds is the microorganism (SUBRAMANIAM et al., 2010). Therefore, yeasts *R. glutinis* and *P. rhodozyma* have been extensively studied because of their great ability to produce betacarotene and astaxanthin, thus demonstrating great potential for industrial applications.

Microbial consortium is common in natural ecological environments. There is an increase in enzyme activity and production of carotenoids at a time when cells are growing under unfavorable conditions. The stress generated through competition for the same substrate

is known to promote adequate biochemical responses, increasing bioproduction (SALAR et al., 2013). Shekhawat et al. (2019) carried out the cultivation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in microbial consortium in a bioreactor using grape broth as carbon source. The authors evaluated the impact of co-cultivation on yeast physiology and metabolic regulation. Microbial consortium generated a competitive and stressful environment for both yeasts and created a different set of challenges for their growth, thus causing an increase in the production of cellular metabolites.

It is important to develop studies involving yeasts able of consuming the same substrate, thus competing for the same carbon source in order to improve bioproduction. Therefore, other possibility for production of carotenoids and lipids is the cultivation in integrated bioreactor, mainly due to its ability to optimize the process, its power to control variables and its safety. Thus, the aim of this work was to compare isolated fermentations with *R. glutinis* and *P. rhodozyma* with the microbial consortium fermentation carried out in an integrated bioreactor, using cassava wastewater as a carbon source.

2 Material and methods

2.1 Substrate treatment and characterization

Cassava wastewater was collected during the processing of cassava flour production, right after pressing the triturated cassava. The cassava wastewater used in the assays was provided by flour house “Folha Verde”, located in Sobrado (07° 08' 43" S, 35° 14' 11" W), state of Paraíba, Brazil. It was stored in a refrigerated environment and transported to the laboratory. All experiments were carried out in the Bioengineering Laboratory of the Federal University of Paraíba (UFPB).

Pre-treatment was carried out in the cassava wastewater before being used in the assays. It was heated at 100°C for 20 min, cooled and centrifuged at 1182g for 5 min, collecting the supernatant and discarding the remaining solid residue. The pre-treated cassava wastewater was then diluted with distilled water until reaching the value of reducing sugars of 10 g/L, according to the methodology described by Ribeiro et al. (2019).

2.2 Microorganism

Rhodotorula glutinis and *Paffia rhodozyma* were acquired from the collection of André Tosello Foundation (Campinas, São Paulo, Brazil) and were stored in Laboratory of Biotechnological Processes of Technology Center (CT) from Federal University of Paraíba (UFPB). They were obtained in lyophilized form, hydrated for 10 days, at temperature of 30°C, in YM medium, containing: 3.0 g/L of yeast extract, 3.0 g/L of malt extract, 5.0 g/L of peptone and 10.0 g/L glucose. After this, they were transferred to Petri dishes containing YM medium with 2% bacteriological agar (YMA medium). The culture plates were incubated at 30°C for 48 hours and stored at 5°C (RIBEIRO et al., 2019).

2.3 Pre-inoculum

The microorganisms were transferred to 300 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium (YM medium): glucose (10 g/L), peptone (5 g/L), yeast extract (3 g/L) and malt (3 g/L). Thereafter, incubated at 30°C, shaken at 150 rpm for 24 h. Then, yeast cells were collected by centrifugation at 1182g for 5 min. In order to make a final cell concentration of approximately 10^9 cells/mL, the cells were suspended in sterile distilled water and the determination was performed using a Neubauer chamber.

2.4 Fermentation in Bioreactor

Ribeiro et al. (2019) studied the production of biomass and carotenoids using *R. glutinis* in a 200 mL Erlenmeyer flask and cassava as a substrate. In this work, these optimized operating conditions were used to carry out fermentations in a Tecnal Tec-Bio-V-4.5L bioreactor with 3 L of culture medium. A temperature of 30 °C, agitation of 150 rpm, initial pH 7.0 and a time of 96 h of cultivation were used. In order to increase the nitrogen concentration, supplementation with ammonium sulfate (5 g/L) was performed. Assays were performed in triplicate.

2.5 Analytical methods for evaluating microbial kinetics Biomass

Aliquots of 2 ml were taken for analysis of cell concentration and microbial kinetics during the time intervals of 0, 12, 24, 36, 48, 72, 84 and 96 hours of cultivation. Each sample was centrifuged at 11200g for 3 min, where the biomass growth was analyzed by turbidimetry of the medium in a model U2M Quimis spectrophotometer at 600 nm. The medium without cells, and at the same dilution of the samples, was used as a baseline. To quantify the biomass

concentration, a standard curve was used with optical density values as function of dry biomass concentration and all samples were analyzed in triplicate.

Reducing sugars (RS)

The modified DNS method originally proposed by Miller (1959) was used. After performing the standard curve, 0.5 mL of sample and 0.5 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) solution were used, which were incubated for 5 minutes at 100 °C. The reaction was cooled with an ice bath and sample analysis was performed at 540 nm.

Extraction and quantification of total carotenoids

Total carotenoid determinations were made every 12 h with 5 mL of the sample, collected and then transferred to Falcon tube. After centrifuging, the supernatant was discarded, and 2 mL of dimethyl sulfoxide at 60 °C and 0.5 g of glass beads were added. Then, whole set was vortexed for 2 min. Afterward, the system was incubated at 60 °C for 15 min. Then, 2 ml of petroleum ether and 2 ml of acetone were added and a further 2 min stirring was performed. Finally, 2 mL of 20% NaCl solution (w/v) were added and vortexed for 1 min. The whole set was then centrifuged with 1452g for 10 min and then 3 ml of the supernatant were taken and read at 450 nm. The absorbance was then converted to concentration using Eq. 1 (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

$$\text{Total Carotenoids} = \frac{A \times V \times 104}{a \times m} \quad (\text{Eq1})$$

Where:

[Total carotenoids]: concentration of total carotenoids in µg/g of cell;

A: absorbance at 450 nm;

V: volume of sample extract;

a: molar absorptivity of the chemical species (carotenoids in general = 2592);

m: sample weight

Total lipids

After assays, the determination of total lipids was performed and, for this, the method described in Bligh & Dyer (1959) was used. The cells were centrifuged at 1182g for 5 min, then, they were dried in an oven at 105°C for 24 h and after ground in a mortar to obtain a fine powder. Cell wall breakage was performed by acid hydrolysis and therefore 5 mL of 2N HCl was added to 200 mg of dry sample and placed in a water bath at 80°C (model 105 Di-F, Dellta) for 1 h. Afterwards, lipids were extracted with 11.6 ml of a mixture of chloroform: methanol: distilled water (1:1:0.9).

Yield and productivity

Each conversion factor was calculated according to carotenoids produced per unit weight of substrate consumed (Y_p/s), biomass produced per unit weight of substrate consumed (Y_x/s) and carotenoids produced by cell dry mass unit (Y_p/x) as well as the carbon source (TC), substrate consumption rate (QS) and cell productivity (QX) and carotenoids (QP) were determined in the different runs. The total production of lipids (g/L) was found at the end of process.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physical Chemical characteristics of cassava wastewater

The physicochemical characteristics of substrate used in cultivation affect not only the biosynthesis activity of biomass but also the growth rate of microorganism. Table 1 presents data obtained from the analysis of cassava wastewater that are required for the development of microorganisms during fermentation, among them, high concentrations of reducing sugars (32.24 g/L) and proteins with 1.58%. The pH of cassava wastewater used was 5.3, which is an optimal value for a culture medium intended for yeast cultivation, as it inhibits the growth of other microorganisms during storage (AKSU; EREN, 2007).

Table 1. Composition of the pre-treated cassava wastewater used in this work.

Parameter	Values
Moisture (%)	93.54 $\pm$ 0.35
Protein (Bradford) (%)	1.58 $\pm$ 0.03
Reducing sugars (g/L)	32.24 $\pm$ 0.66
Non-reducing sugars (g/L)	14.93 $\pm$ 1.15
Total sugars (g/L)	47.18 $\pm$ 1.91
Ash (%)	1.00 $\pm$ 0.30
Total soluble solids ($^{\circ}$ Bx)	7.30 $\pm$ 0.21
pH	5.3 $\pm$ 0.03
Specific mass (g/L)	1097.12 $\pm$ 0.8

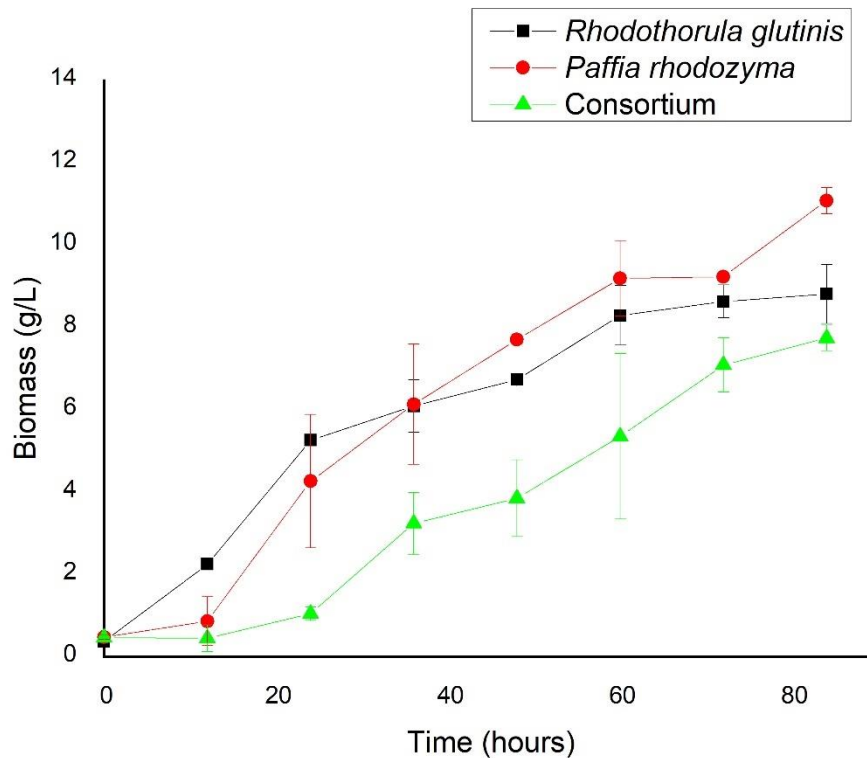
3.2 Biomass production

Figure 1 shows the behavior of microorganisms during biomass production. The highest growth was observed at the end of fermentation with *P. rhodozyma* (11.08 g/L), while in the cultivation with *R. glutinis*, the biomass produced was 8.81 g/L. During the mixed fermentation 7.74 g/L were produced. In all fermentations, microorganisms had cassava wastewater with initial concentration of 10 g/L of RS, pH adjusted to 7.0 and supplementation of 5 g/L of ammonium sulfate.

It can be seen in Figure 1 that biomass growth of individual cultivations was much higher than that observed in mixed fermentation. The competition for the same substrate made each microorganism directs its efforts in the maintenance and not in the growth of its biomass. Petti et al. (2011) demonstrated that yeast survival during starvation showed to be dependent on nature of the insufficient nutrient and that in general, the search for "natural" nutrients such as carbon, phosphate, nitrogen or sulfate sources results in low mortality rates.

Biomass production in consortium cultivation showed the lowest growth, possibly due to the adaptation to the medium and the presence of two microorganisms competing in the same system for the availability of sugar throughout the entire cultivation period (Fig. 2). It is also important to note that the behavior of profiles in the growth of biomass occurs after a period of stability, which confirms the period of adaptation of microorganism to the mixed culture. The growth of red yeasts such as *R. glutinis* and *P. rhodozyma* can be influenced by several factors, such as the quality and quantity of carbon and nitrogen sources, stress, agitation, temperature, minerals, and vitamins (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014; YEN; YANG; YU, 2012).

Figure 1: Biomass concentration throughout the process of single and mixed cultivation.

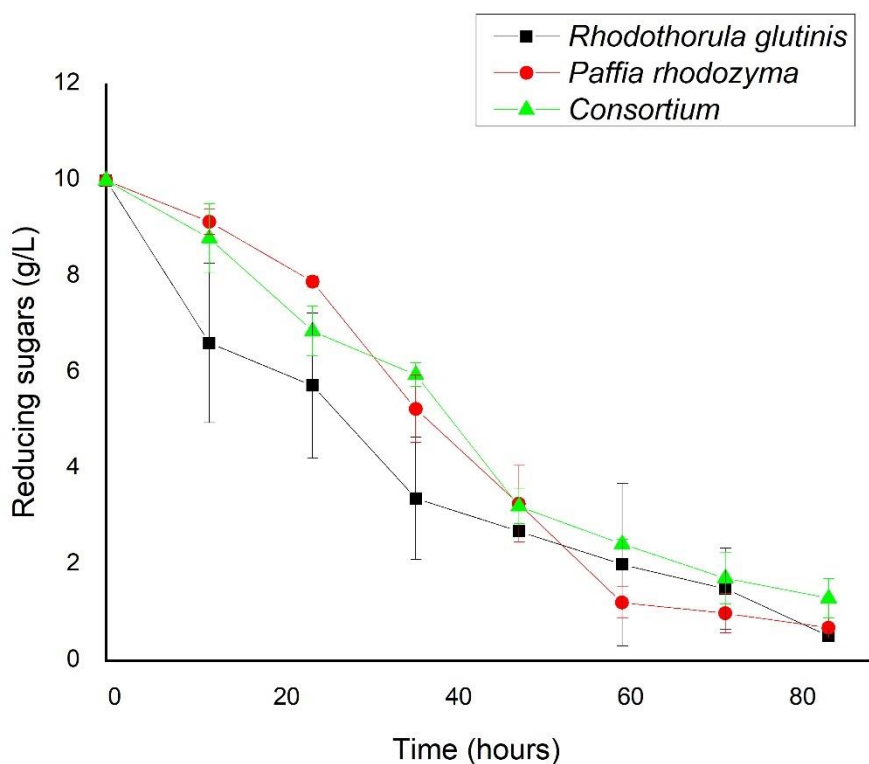


3.3 Consumption of reducing sugars

Figure 2 presents the results of reducing sugars converted during the three fermentation conditions. The profile of reducing sugars during fermentation with cassava wastewater showed that this residue is efficient, as it was able to provide a carbon source (energy source) in order to improve yeast growth. The sugar profile of cassava wastewater is widely reported in

literature, it has approximately 2.6% of dextrin, 1.4% of maltose, 32.1% of sucrose, 38.3% of glucose and 25.6% of fructose (Damasceno et al., 2003). The values of reducing sugars were adjusted to 10 g/L (RIBEIRO et al., 2019) and at the end of the three fermentation processes it was found 95% (9.5 g/L), 93.1% (9.31 g/L) and 87% (8.7 g/L) of RS available in fermentations with *Rhodotorula glutinis*, *Paffia rhodozyma* and consortium cultivation, respectively.

Figure 2: Values of reducing sugars throughout the fermentation process (84 h).

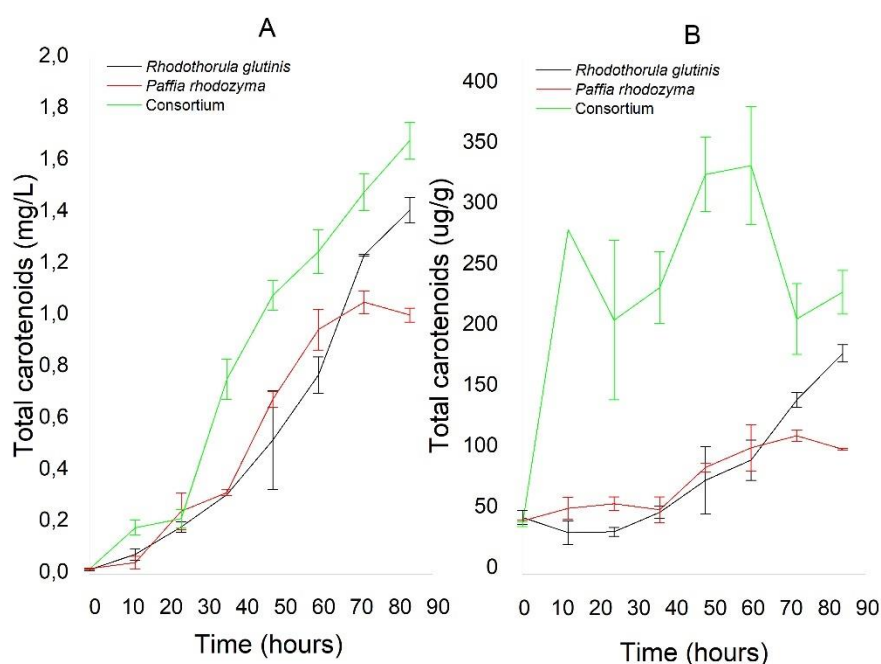


3.4 Carotenoid production

The microbial production of carotenoids is intracellular, and therefore, series of processes are important for recovering and processing of this bioproduct (CARDOSO et al., 2017). Intracellular accumulation ($\mu\text{g/g}$) and volumetric production of carotenoids (mg/L) were

analyzed. The amount of carotenoids extracted and their relationship to production are shown in Figure 3A and 3B respectively. 1.6 mg/L (181.6 $\mu\text{g/g}$) were produced in fermentation using *R. glutinis*; 1.0 mg/L (102.7 $\mu\text{g/g}$) when the microorganism used was *P. rhodozyma* and 1.68 mg/L (232 $\mu\text{g/g}$) in mixed fermentation. This production of 232 μg of carotenoids per gram of cells with 60 hours of cultivation is a very promising result, as it confirms the strategy of consortium cultivation as important in optimizing the production of this bioproduct. Another noteworthy point is that even with a lower biomass production in the consortium cultivation compared to the individual cultivation, the production of carotenoids was more effective in the fermentation with microorganisms in consortium. Han et al. (2005) studied the response of microorganisms to stress caused by the shortage of essential amino acids and concluded that the lack of nutrients was the main reason that led to increase in concentration of carotenoids produced. In yeast, the most important role of carotenoids is inactivate free radicals that are normally produced by cells in their metabolism, for example oxygen singlets ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radicals ($^{\bullet}\text{OH}$) peroxides and other oxidants (BERERA et al., 2010).

Figure 3: Carotenoid production by individual and mixed cultivation of *Rhodotorula glutinis* and *Paffia rhodozyma*.



3.4 Fatty acids and Lipids production

The composition of the main fatty acids analyzed is described in Table 2. With values of 68.85% in the fermentation with *R. glutinis*, 67.79% in the fermentation with *Paffia* and 68.08% when the strategy used was the consortium between the two microorganisms, oleic acid (C 18:1 n9 cis) was the main fatty acid found, followed by palmitic acid (C 16:0) where 16.6%, 17.94% and 18.3% were found and stearic acid (C 18:0) 5.75%, 5.75% and 6.28% in fermentations with *R. glutinis*, *Paffia rhodozyma* and in the Consortium respectively.

According to the literature (Yen et al., 2012; Kot et al., 2019b), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18 :2) and linolenic acid (C18:3) are responsible for more than 80% of the total fatty acids in *R. glutinis* lipids. According to Kikukawa Hiroshi et al., palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2) represent the majority the composition of fatty acids produced by the red yeast *Paffia rhodozyma*.

Table 2: Composition of fatty acids produced during each fermentation

Ácido graxo ^a	Microrganismos produtores ^b		
	<i>Rhodotorula Glutinis</i>	<i>Paffia rhodozyma.</i>	Consortium
C14:0	0,75 +- 0,09	0,63 +- 0,16	0,98 +- 0,28
C16:0	16,6 +- 0,07	17,94 +- 0,02	18,3 +- 0,24
C16:1 n7	1,26 +- 0,06	1,25 +- 0,01	0
C17:0	0	0,49 +- 0,04	0
C17:1 n10	0	0,35 +-0,12	0
C18:0	5,75 +- 0,28	5,75 +- 0,25	6,28 +- 0,32
C18:1 n9 cis	68,85 +- 0,24	67,79 +- 0,48	68,08 +- 0,9
C18:2 n6 cis	4,1 +- 0,28	2,78 +- 0,31	2,51 +- 0,83
C18:3 n3	0,25 +- 0,01	0,59 +- 0	0,53 +- 0,07
C20:1 n9	0,34 +- 0,02	0,4 +- 0,06	0,29 +- 0,17
C20:4 n6	0	0	0
C21:0	0,7 +- 0,08	0	0,21 +- 0,03
C22:0	0,37 +- 0,08	0,55 +- 0,03	0,39 +- 0,17
C23:0	0	0	0
C24:0	1,02 +- 0,01	1,21 +- 0,03	1,35 +- 0,08

^a C14:0, myristic acid; C16:0, palmitic acid; C16:1 n7, palmitoleic acid; C17:0, heptadecanoic acid; C17:1 n10, cis 10 heptadecanoic acid; C18:0, stearic acid; C18:1 n9 cis, oleic acid; C18: 2 n6 cis, linoleic acid; C18:3 n3, linolenic acid ω-3; C20:1 n9, gondoic acid; C20:4 n6, arachidonic acid; C21:0, heneicosanoic acid; C22:0, behenic acid; C23:0, tricosanoic acid; C24:0, lignoceric acid.

^b Data represent the mean ± standard deviation (n = 3)

Another important product in order to analyze is the lipids. The amount of lipids shows the ability of microorganism to generate an energy source from a residue. The amount of lipids obtained after cultivation in bioreactor under the three experimental conditions was 0.81 g/L (9.56 g/100 g) with *R. glutinis*; 4.19 g/L (44.04 g/100 g) with *P. rhodozyma* and 6.04 g/L (84.29 g/100g) in consortium cultivation. The bioproduction of lipids in the mixed fermentation was quite significant, demonstrating the importance of this experimental condition for greater efficiency during fermentation. To confirm this result, the productivity of three cultivation conditions was calculated and is shown in Table 2. It can be observed that results of consortium cultivation presented the best values when compared to the other assays. Biomass produced per unit of substrate ($Y_{x/s}$) was 0.82 g/g; carotenoids produced per unit of dry cell ($Y_{p/x}$) was 0.21 mg/g and carotenoids produced per substrate ($Y_{p/s}$) was 0.17 mg/g. The consumption of carbon source (QS) was 0.17 g/L/h; cell productivity (QX) was 0.14 g/L/h and carotenoid productivity (QP) 0.03 g/L/h. These values are highly promising when the aim is scale production of these biomolecules. It is known that lipid profile of microbial metabolites is directly influenced by carbon source (YEN; YANG; YU, 2012). In this work, the yeasts were cultivated in cassava wastewater and it showed its efficient ability as substrate in cultivation of microorganisms.

Table 2: Productivity of bioreactor assays using cassava wastewater as carbon source.

	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$	$Y_{p/s}$	QX	QP	QS
	(g/g)	(mg/g)	(mg/g)	(g/L/h)	(g/L/h)	(g/L/h)
<i>R. glutinis</i>	0,89	0,15	0,13	0,12	0,017	0,13
<i>P. rhodozyma</i>	1,05	0,11	0,12	0,13	0,14	0,11
Consortium	0,82	0,21	0,17	0,14	0,03	0,17

Where: ($Y_{x/s}$) biomass produced per unit weight of substrate consumed; ($Y_{p/x}$) carotenoids produced per unit dry weight of cells; ($Y_{p/s}$) carotenoids produced per unit weight of substrate consumed; (QS) rate of consumption of carbon source; (QX) cell productivity and (QP) carotenoid productivity.

4 CONCLUSION

The study of the yeasts *Rhodothorula glutinis* and *Paffia rhodozyma* showed greater efficiency when cultivated in consortium compared to their individual cultivation. Bioreactor cultivation in medium containing cassava wastewater as carbon source produced a remarkable

amount of important intracellular metabolites such as carotenoids (1.68 mg/L) and lipids (6.04 g/L) in addition to supporting the feasibility of using cassava wastewater as substrate to be used in biotechnological process.

5 REFERENCES

- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical engineering journal**, v. 35, n. 2, p. 107–113, 2007.
- BERERA, R. et al. The light-harvesting function of carotenoids in the cyanobacterial stress-inducible IsiA complex. **Chemical Physics**, v. 373, n. 1–2, p. 65–70, 2010.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- CARDOSO, L. A. C. et al. Microbial production of carotenoids A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 139–146, 2017.
- CHUZEL, G. The cassava processing industry in Brazil: Traditional techniques, technological developments, innovations and new markets. 2001.
- DA SILVA, J. et al. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. 2018.
- ENBRAPA, E. B. DE P. A. Mandioca em números. **Obtido em 26 de maio de 2021 de** <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>, 2018.
- HAN, J. R. et al. Effect of oxidative stress and exogenous β -carotene on sclerotial differentiation and carotenoid yield of *Penicillium* sp. PT95. **Letters in applied microbiology**, v. 40, n. 6, p. 412–417, 2005.
- HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, v. 7, p. 31–36, 2014.
- IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Obtido em:** <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de->

[mandioca/item/download/35935_814f9e52b5de282f4075947c071edda2#:~:text=A%20estimativa%20de%20produ%C3%A7%C3%A3o%20brasilei](#), v. Instituto, 2021.

KIKUKAWA, Hiroshi, et al. Effect of ethanol on astaxanthin and fatty acid production in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132.3: 2034-2041.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. [s.l.] Elsevier, 2011.

MAZURCZAK, P. et al. Utylizacja odpadów pochodzących z zakładów przemysłu spożywczego i paliwowego z wykorzystaniem lipolitycznych drożdży *Yarrowia lipolytica*. **Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych**, v. 588, 2017.

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

MILLER, M. W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 286–291, 1976.

PARK, Y.-K.; NICAUD, J.-M.; RODRIGO, L. A. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 304–317, 2018.

PETTI, A. A. et al. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 45, p. E1089–E1098, 2011.

RIBEIRO, J. E. S. et al. *Rhodotorula glutinis* cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101419, 2019.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. [s.l.] CRC Press, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. [s.l.] International Food Policy Research Institute (IFPRI) Washington, 2004. v. 2

SALAR, R. K. et al. Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 53–60, 2013.

SHEKHAWAT, K. et al. RNA-seq based transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in mixed-culture fermentations under anaerobic conditions. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2019.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267–2278, 2012.

SUBRAMANIAM, R. et al. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1271–1287, 2010.

SUMAN, P. A. et al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, p. 379–384, 2011.

VIADA PUPO, E.; GÓMEZ ROBLES, L.; CAMPAÑA MARRERO, I. R. Estrés oxidativo. **Correo Científico Médico**, v. 21, n. 1, p. 171–186, 2017.

VIÑARTA, S. C. et al. Oleaginous yeasts from Antarctica: screening and preliminary approach on lipid accumulation. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1360–1368, 2016.

WAGNER, J.R.; RAMBLA, M.A.O.; LEGARRETA, I. G. Las levaduras y sus productos derivados como ingredients en la industria de alimentos. 1ªed. Bernal: Universidad Nacional de Quilmes,. 2008.

YEN, H.-W.; YANG, Y.-C.; YU, Y.-H. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 453–456, 2012.