

ESTUDO DA AMPLIAÇÃO DE ESCALA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR *RHODOTORULA SP.* CNPAT-02 EM PROCESSO BATELADA PARA OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES

L. S. C. BRANCO^{1,2}, M. M. T. ALMEIDA¹, T. M. CAETANO¹ e G. A. S. PINTO¹, H. M. C. AZEREDO

¹Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Bioprocessos, R. Dra. Sara Mesquita, 2270 – Fortaleza/CE - CEP.: 60.511-110

e-mail: leisecbranco@gmail.com; gustavo@cnpat.embrapa.br

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

RESUMO – O gênero *Rhodotorula* é conhecido por produzir quantidades consideráveis de carotenóides. Atualmente tem sido estudado devido a seu potencial para produção industrial, uma vez que oferece vantagens sobre os outros gêneros em termos de taxa de crescimento elevada e uso de substratos de baixo custo. O objetivo deste trabalho foi ampliar a escala de fermentação de *Rhodotorula sp.* CNPAT-02 até biorreator de bancada em processo batelada para obtenção de carotenóides. A levedura foi cultivada em um fermentador tanque agitado de 14L, para tanto foram testados inicialmente o volume de meio de cultura (50, 100 e 150 mL) e a transferência do meio fermentado para frasco de 2L com 24, 36 e 48h. Os carotenóides foram extraídos e quantificados utilizando solventes orgânicos. Ao final de 120h de fermentação a concentração obtida foi de $11,63 \pm 1,29 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e produtividade $2,32 \text{ g/L.h}$ de carotenóides.

PALAVRAS-CHAVE: carotenóides; biomassa; fermentador.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Rhodotorula* são conhecidos por produzir quantidades consideráveis de carotenóides. Atualmente, este gênero tem sido estudado devido a seu potencial para produção industrial, uma vez que oferece vantagens sobre os outros gêneros em termos de taxa de crescimento elevada e uso de substratos de baixo custo. O seu crescimento pode ocorrer através da utilização de matéria-prima barata, como caldo ou melaço de cana-de-açúcar, soro do leite, mosto, farinha de feijão hidrolisada, extratos de soja e farinha de milho (Malisorn; Suntornsuk, 2009).

Os carotenóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Estes pigmentos representam um grupo de moléculas importantes para a indústria farmacêutica, química, de alimentos e de rações, não somente pela sua atividade provitamínica-A, como por sua atividade anticarcinogênica (Squina; Mercadante, 2003).

Em indústrias onde a conversão da matéria-prima em produto se baseia numa conversão biológica, entre todas as etapas que devem ser ampliadas, inclui-se a etapa de biotransformação, realizada em fermentadores. Na grande maioria dos processos, o desenvolvimento natural parte



de uma escala de produção menor para uma escala maior. A variação de escala nesse sentido é conhecida como aumento de escala ou “scale-up”.

As fermentações descontínuas são as mais empregadas para obtenção de vários produtos fermentados e são conhecidas por fermentações por batelada ou processo descontínuo de fermentação. Este processo é o mais utilizado na indústria de alimentos para produção de iogurte, chucrute, pickles, cerveja, vinho, entre outros (Schmidell *et al.*, 2001).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e manutenção da linhagem: levedura *Rhodotorula* sp. CNPAT-02 da coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza/CE. A linhagem foi mantida em ágar Sabouraud segundo a técnica de subcultura. O crescimento ocorreu em estufa BOD a 30°C por 3 a 5 dias. A estocagem foi feita sob refrigeração a 8°C por até 6 meses.

Preparação do inóculo: transferiu-se asepticamente uma amostra da linhagem estocada, para frasco de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de caldo Sabouraud e incubado a 30°C, 150 rpm por 24 horas em agitador orbital. Após a quantificação da biomassa, inoculou-se nos meios de fermentação o volume necessário para a obtenção de 0,1 g.L⁻¹ de massa seca.

Preparação do meio de cultivo: Para a preparação do meio Sabouraud foram utilizadas 10 g.L⁻¹ de peptona de soja e 20 g.L⁻¹ de dextrose. O meio sintético de crescimento da levedura foi preparado de acordo com a seguinte composição (expressa em g.L⁻¹): dextrose: 25,0; extrato de levedura: 3,57; KH₂PO₄: 2,0; K₂HPO₄: 2,0 e MgSO₄.7H₂O: 0,1 e pH 6,0 (Bhosale *et al.*, 2003). Após a diluição dos nutrientes em

água destilada os meios foram esterilizados a 121°C por 15 min. Para tanto, foram coletados 10mL do meio fermentado, centrifugado a 6000rpm durante 10 min. O sobrenadante foi separado e estocado sob refrigeração para posteriores análises.

Influência do volume de meio de cultura: a fim de avaliar a influência do volume do meio de cultivo que correspondesse à melhor produção de biomassa, conduziram-se ensaios em erlenmeyers de 500 mL contendo 50, 100 e 150 mL de meio de cultura. Os meios foram inoculados com 0,1 g.L⁻¹ de massa seca e incubados em agitador orbital a 30°C sob agitação de 150 rpm durante 60 horas. Amostras foram retiradas a cada 12 horas para análises posteriores.

Efeito da transferência do meio fermentado de acordo com a idade do inóculo: nesta etapa, estudou-se o tempo de melhor produção de biomassa para transferência em erlenmeyer de 2L. Os erlenmeyers contendo 450 mL de meio de cultivo foram inoculados com 50 mL de suspensão microbiana com 24, 36 e 48 horas de crescimento. Os meios inoculados foram incubados em shaker orbital a temperatura de 30°C sob agitação de 150 rpm por 24 horas.

Biorreator empregado no estudo: foi o New Brunswinck Scientific Co., modelo BioFlo 3000 com capacidade nominal de 14L e volume máximo de trabalho de 10L. Para este estudo, utilizaram-se duas turbinas de 6 pás planas, também conhecidas como turbinas “Rushton”. Com a finalidade de melhorar a agitação do meio reacional, calculou-se o espaçamento entre as turbinas para o volume de trabalho (10L). Para cada turbina foi determinado um espaçamento de acordo com a altura do líquido no fermentador que correspondia a 27,8 cm. A altura do líquido foi calculada utilizando o diâmetro do tanque (21,4 cm) e o volume reacional (0,01 m³). Desta forma, a primeira



turbina ficou posicionada na extremidade inferior do eixo central, enquanto a segunda situava-se a 9,3 cm acima. O fermentador também foi equipado com quatro chicanas (baffles) equidistantes, posicionadas a 90° em relação à parede.

Produção de biomassa em Biorreator: o meio de cultura para a fermentação em biorreator foi preparado diretamente na dorna. Após o ajuste do pH, foi adicionado óleo de soja comercial numa concentração de 0,30%, como agente de prevenção de espuma. O meio preparado foi esterilizado a 121°C durante 30 min. Ao final da esterilização o fermentador foi retirado da autoclave e submetido a um teste de esterilidade durante 72 horas à temperatura ambiente em bancada de trabalho. Se após três dias o meio não apresentasse sinal de contaminação, caracterizado pelo aparecimento de turvação, era liberado para receber a suspensão de inóculo. Antes da inoculação o fermentador foi ligado e os parâmetros de temperatura, agitação e taxa de aeração foram ajustados para 30°C, 250 rpm e 1 vvm⁻¹ respectivamente, durante 30 minutos para a estabilização do sistema. Com o sistema estável, o fermentador foi inoculado assepticamente com 500 mL da cultura fermentada durante 24 horas. A fermentação foi conduzida em batelada simples durante 120 horas, e amostras foram retiradas a cada 12 horas para posteriores análises.

Determinações analíticas: **Biomassa** - quantificada espectrofotometricamente a 600nm com o auxílio de curva-padrão de peso seco previamente estabelecido; **Açúcares redutores totais** - determinados pelo método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme IAL (1985); **pH** - potenciometricamente; **Cor instrumental** - determinado por análise colorimétrica utilizando colorímetro do fabricante Minolta CR-300 na escala padrão de cromaticidade na faixa de -60 até +60 para

os parâmetros **a** e **b**. A pigmentação produzida pela levedura da espécie *Rhodotorula* está relacionada com o parâmetro **a**, um dos parâmetros indicados para a identificação dos pigmentos carotenóides; **Análise de Gram** – realizada através da coloração de Gram conforme Soares (1991); **Determinação de carotenóides** – as análises foram realizadas através do método DMSO (dimetilsulfóxido) conforme Squina (2003). A biomassa foi agitada em vortex por 1 minuto com 2,5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) a 55°C, em tubo de vidro. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de solvente mais apolar: éter etílico, acetato de etila ou éter etílico/acetato de etila (1:1), em seguida o tubo foi novamente agitado por 1 minuto e centrifugado a 3000 rpm por 5 min para separação das fases. Este procedimento foi repetido 6 vezes para extração completa dos carotenóides. Após a extração exaustiva dos carotenóides, todo o extrato foi colocado em balão de 50 mL e aferido com a mistura de éter etílico/acetato de etila (1:1). Os carotenóides foram quantificados espectrofotometricamente a 450 nm, utilizando branco preparado com a mesma mistura de solventes e curva-padrão de β -caroteno.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Efeito do volume do meio de cultura sobre a produção de biomassa

Primeiramente, avaliou-se na ampliação de escala, a influência da quantidade de meio de cultura na produção de biomassa. Quando a *Rhodotorula* sp. CNPAT-02 foi cultivada em agitador orbital por 60 horas, a maior concentração de biomassa foi alcançada quando foram utilizados um volume de 50 mL de meio de cultura, obtendo-se 13,2 g.L⁻¹ de biomassa seca. O aumento do volume de meio no frasco levou à redução da formação de



biomassa e do consumo da fonte de carbono. Este resultado observado se deve, provavelmente, à exigência do microrganismo em relação à taxa de transferência de oxigênio necessária para alcançar um bom desempenho no crescimento e na produção de β -caroteno. A concentração de oxigênio dissolvido é um fator importante na síntese de carotenóides que é intensificado por um determinado nível de estresse oxidativo (Mantzouridou *et al.*, 2005).

Foi observado também que o erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura fermentado apresentou consumo de substrato, aproximadamente 80% dos açúcares iniciais. Em contrapartida, quando se utilizaram volumes maiores de meio de cultura pôde se observar um acúmulo da fonte de carbono no meio, não sendo completamente consumida pela levedura, ou seja, o consumo da fonte de carbono foi limitado provavelmente, devido à menor taxa de transferência de oxigênio no meio agitado.

A taxa de transferência de oxigênio é predominantemente influenciada pelas condições de agitação ou pela intensidade de agitação dos frascos e pelas propriedades físico-químicas do meio de cultura (Mantzouridou *et al.*, 2005).

A taxa de transferência do oxigênio em diferentes volumes de meio de cultura, que foram agitados a 150 rpm, foi influenciada pela diminuição da área superficial do meio dentro do frasco de erlenmeyer à medida que o volume do meio de cultivo aumentava. A Figura 2 mostra os diferentes volumes de meio de cultura estudados, colocados em frascos idênticos de erlenmeyer.



Figura 2 – Variação do volume de meio de cultura em frascos erlenmeyer contendo 50 mL, 100 mL e 150 mL de meio, respectivamente.

A obtenção de elevadas concentrações do produto desejado, depende enormemente da capacidade de se transferir O_2 para a fase líquida, principalmente nos instantes mais avançados do processo, onde a concentração celular pode ser elevada (Schmidell *et al.*, 2001).

De acordo com dados preliminares obtidos da variação do volume de meio, foi possível observar a influência da taxa de transferência de oxigênio variando-se, somente, o volume inicial do meio de cultivo. Após 60h de fermentação, os ensaios realizados mostraram que, a melhor taxa de conversão do substrato, com maior concentração de biomassa e melhor consumo do substrato, restando apenas $1,24 \text{ g.L}^{-1}$ da fonte de carbono no meio, foi obtida no processo fermentativo que correspondia a 50 mL de meio de cultura. A Tabela 1 mostra os diferentes volumes do meio de cultura com valores correspondentes as dimensões do líquido no erlenmeyer, à concentração final de biomassa e fatores de conversão.



Tabela 1 – Valores de altura e diâmetros obtidos de acordo com a variação do volume de meio de cultivo.

Volume de meio (mL)	Altura do líquido (mm)	Diâmetro ϕ (mm)	S_f ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_f ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$Y_{x/s}$
50	7	96	1,24	13,2	0,62
100	14	94	4,86	9,20	0,43
150	21	92	7,27	7,12	0,36

Assim, de acordo com os ensaios realizados, variando-se o volume do meio de cultivo, definiu-se que o erlenmeyer contendo 50 mL de meio fermentado, seria adequado para a realização das próximas etapas da ampliação de escala.

O parâmetro a^* representa coordenada cromática que possui variação até + 60. O a^* indica as direções das cores: sendo $+a^*$ a direção do vermelho, $-a^*$ direção do verde. A pigmentação dos carotenóides está relacionada com o parâmetro a^* indicando a diferença de coloração que varia do vermelho ao verde. Segundo Costa (1992), verificou-se que, temperaturas de incubação, em torno de 25°C, a concentração de pigmentos rosados (toruleno e torularrodina) aumenta. Nesse contexto, foi possível observar ao longo do tempo que, no erlenmeyer contendo 50 mL de meio, houve um aumento da cromaticidade a^* durante a fermentação e, ao final de 60 horas foi observado uma estabilização do pigmento.

A cromaticidade a^* para os erlenmeyers contendo 100 e 150 mL de meio apresentaram perfil semelhante a 50 mL, havendo um aumento da cromaticidade a^* no início e posteriormente uma estabilização da pigmentação, conforme mostra a Figura 3.

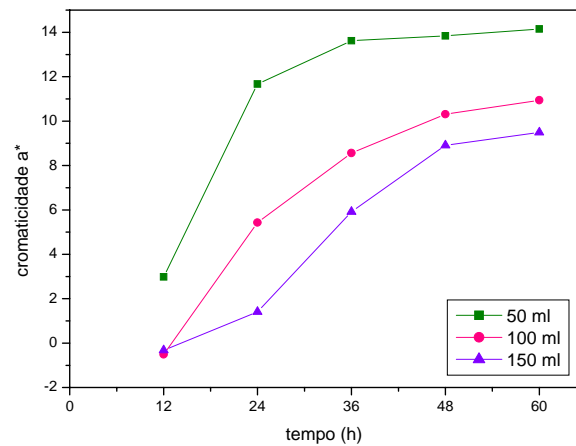


Figura 3 – Perfil da cromaticidade a^* (contribuição de vermelho a verde) para diferentes volumes de meio.

O erlenmeyer contendo 50 mL de meio apresentou o melhor perfil de cor em relação a cromaticidade a^* apresentando um valor equivalente a +14,15.

3.2 Efeito da transferência do meio fermentado de acordo com a idade do inóculo

Foram realizados três ensaios de transferência do volume de meio fermentado para erlenmeyer de 2L. Três meios de cultura com volume de 50 mL foram transferidos após 24, 36 e 48 horas de incubação para erlenmeyers de 2L contendo 450 mL de meio. A concentração de inóculo foi de aproximadamente 2,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para todos os tempos estabelecidos.

A Tabela 2 mostra as concentrações de biomassa e fator de conversão após 24 horas de incubação de cada erlenmeyer de 2L com 500 mL de meio fermentado.



Tabela 2 – Valores da concentração de biomassa e fator de conversão do substrato em biomassa

Idade do Inóculo	Concentração de biomassa (X_f) g/L ⁻¹	$Y_{x/s}$
24 horas	4,22	0,31
36 horas	4,48	0,35
48 horas	4,11	0,32

Após 24 horas de fermentação foi possível observar que os valores da concentração de biomassa (X_f) obtidos para os três ensaios realizados foram praticamente iguais, sendo possível, assim estudar o efeito da idade das células na produção de cor.

Apesar da pequena diferença entre o fator de conversão $Y_{x/s}$ (conversão estequiométrica de glicose em biomassa), calculada para cada tempo de incubação, o meio transferido para erlenmeyer de 2L após 36 horas de incubação, expressou a melhor taxa de conversão do substrato.

Neste ensaio experimental também foi avaliada a intensidade de cor dos pigmentos carotenóides formados. A cromaticidade a^* avaliada no meio fermentado em erlenmeyer de 2L, após 24h de incubação, está representado graficamente na Figura 4.

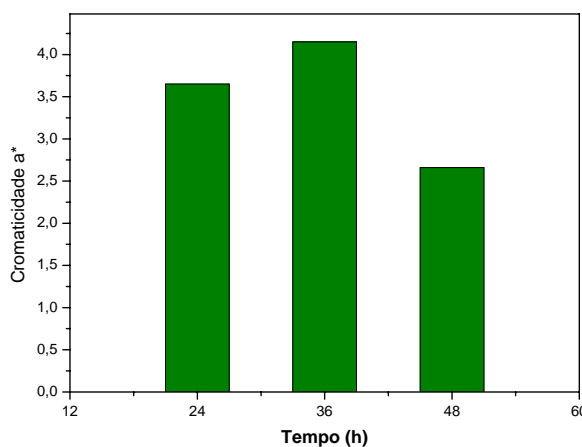


Figura 4 – Perfil do parâmetro a^* durante a fermentação de 500 mL de meio de cultura em erlenmeyer de 2L.

No meio de cultura que recebeu inóculo com 36 horas de incubação, foi observado o melhor perfil de cor, em relação a coordenada cromática a^* , que está diretamente relacionado com os pigmentos rosados formados pela levedura. Quando comparados aos meios fermentados, inoculados em erlenmeyer de 2L com 24 e 48 horas de incubação, apresentaram menor valor de cromaticidade a^* , indicando menores teores de pigmentos carotenóides presentes na amostra.

3.3 Fermentação em Biorreator de Bancada

De acordo com os resultados avaliados nos processos fermentativos anteriormente estudados, o meio de 50 mL que foi adicionado ao erlenmeyer de 2L com 36 horas de incubação, foi selecionado como o meio de cultivo em que se obteve o melhor valor de coloração relacionado aos pigmentos produzidos pela levedura, maior rendimento em taxa de crescimento celular e maior conversão do substrato. Após 24 horas incubação do erlenmeyer de 2L contendo 500 mL de meio fermentado, foi utilizado para inocular um fermentador de 14L com volume reacional de trabalho de 9,5L de meio de cultivo, conforme representado pela Figura 5.

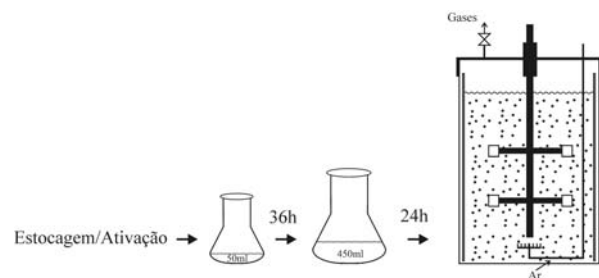


Figura 5 – Desenho esquemático da ampliação de escala de processos desenvolvidos neste estudo.

Para cada fermentação realizada, amostras foram retiradas a cada 24 horas com



a finalidade de identificar possíveis contaminações por bactérias, através da técnica de coloração de Gram, pois as leveduras são unicelulares e são facilmente diferenciáveis das bactérias por apresentarem dimensões maiores e por suas propriedades morfológicas. Contudo, foi possível observar que nas fermentações operadas em biorreator não foi verificado nenhum indício de contaminação bacteriana (Pelczar *et al.*, 1996).

A Figura 6 representa o perfil da produção de biomassa e do consumo de açúcares redutores com seus respectivos desvios, pela levedura durante a fermentação, em intervalos de tempo de 12 horas. A concentração inicial de células no fermentador foi de $0,22 \text{ g.L}^{-1}$. Desta forma, com as análises realizadas, foi possível observar que a partir de 84 horas de fermentação, a quantidade de biomassa produzida praticamente manteve-se constante até o final do processo fermentativo. No entanto, a taxa de crescimento celular alcançada com 84 horas de fermentação foi de $11,54 \pm 1,23 \text{ g.L}^{-1}$. Após 120 horas do processo fermentativo a concentração máxima de biomassa alcançada foi de $11,85 \pm 1,10 \text{ g.L}^{-1}$, neste tempo a concentração de açúcares redutores foi de $4,36 \pm 1,09 \text{ g.L}^{-1}$, equivalente a aproximadamente 17% dos açúcares iniciais.

A partir de dados obtidos, sobre a taxa de crescimento da levedura, permitiu avaliar o desempenho do processo fermentativo em diferentes intervalos de tempo.

Desta forma, o perfil da produtividade em biomassa está representado na Figura 7 mostrando que a melhor produtividade, em crescimento celular, foi com 36 horas de fermentação.

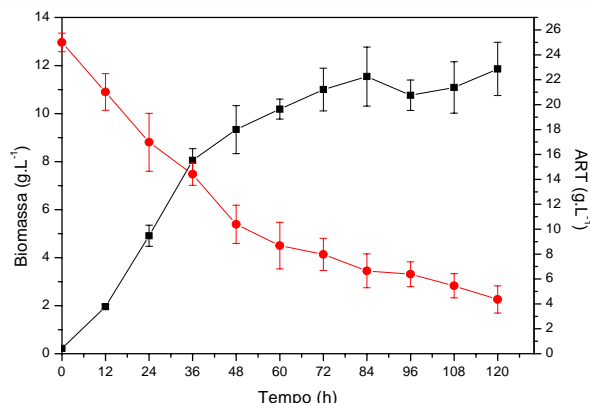


Figura 6 – Perfil de biomassa (■) e ART (●) de *Rhodotorula sp.* CNPAT02 conduzido em batelada simples.

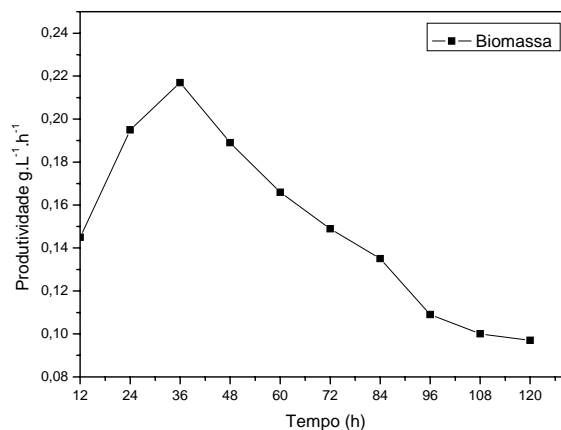


Figura 7 – Produtividade de biomassa de *Rhodotorula sp.* CNPAT02 conduzido em biorreator de bancada.

Nos processos fermentativos realizados avaliou-se a concentração de carotenóides e biomassa e a coloração do meio fermentado. De acordo com a Figura 8, é possível observar a concentração de carotenóides totais, o comportamento da coordenada cromática a^* e o perfil de biomassa em cada intervalo de tempo durante o processo fermentativo em biorreator.

Desta forma, a Figura 8 mostra que a coordenada cromática a^* , acompanha a curva de crescimento da levedura e o teor de pigmentos carotenóides formados pela levedura, seguindo uma mesma tendência no perfil gráfico até o final do processo. Este resultado obtido demonstra que os



carotenóides formados possivelmente são metabólitos primários, formados ao longo do processo fermentativo. A partir da avaliação dos resultados da Figura 8, foram feitos, posteriormente, cálculos das velocidades específicas de crescimento (μ_x), consumo de glicose (μ_S) e formação de carotenóides (μ_P) pela levedura, para avaliar o comportamento da curva de cada parâmetro.

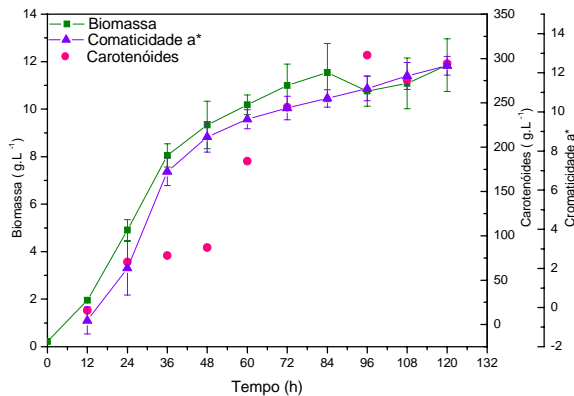


Figura 8 – Perfil da coordenada cromática a*, concentração de biomassa e carotenóides durante a fermentação em biorreator.

A Figura 9 apresenta os resultados de velocidade específica de crescimento de biomassa (μ_x), consumo de substrato (μ_S) e formação de produto (μ_P). As velocidades específicas de consumo de açúcar (μ_S) e a produção de carotenóides (μ_P) apresentam perfis semelhantes, correlacionando-se assim muito bem. A velocidade específica de crescimento (μ_x) da levedura apresenta, aproximadamente, o andamento das outras duas curvas. Diz-se então que a formação de produto (metabólito primário) está associada ao crescimento (Schmidell *et al.*, 2001). Os perfis representados na figura abaixo representam o caso em que o produto formado (o metabólito primário) está diretamente ligado as reações do consumo do substrato (glicose).

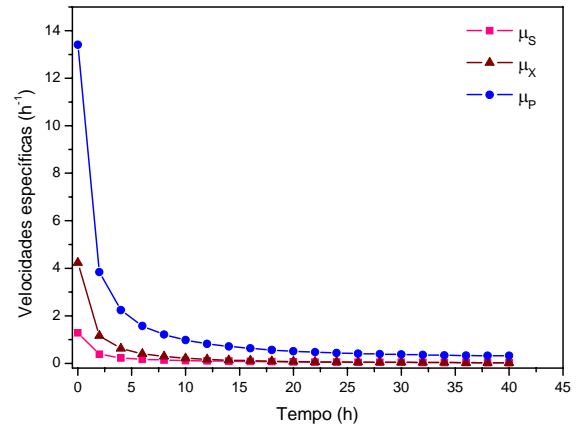


Figura 9 – Variação das velocidades específicas em fermentação submersa.

4. CONCLUSÕES

O volume de meio de cultivo de 50 mL ao final de 60h de fermentação, foi o mais adequado para iniciar a ampliação de escala, apresentando a melhor conversão do substrato ($Y_{x/s} = 0,62$), teor de biomassa ($13,2 \text{ g.L}^{-1}$) e cromaticidade a* (+ 14,15).

A taxa de transferência de oxigênio influenciou significativamente a taxa de crescimento celular, quando variou-se o volume de meio de cultivo durante o processo fermentativo em agitador orbital.

A melhor conversão do substrato ($Y_{x/s} = 0,35$) e maior concentração de biomassa ($4,22 \text{ g.L}^{-1}$) foram obtidas, quando o meio fermentado de 50 mL foi transferido para erlenmeyer de 2L com 36 horas de incubação.

A partir de 84 horas de fermentação, em biorreator, a quantidade de biomassa produzida, praticamente manteve-se constante até o final do processo fermentativo com produção de $11,54 \pm 1,23 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa.

A melhor produtividade alcançada no fermentador, em taxa de crescimento celular, foi com 36h de fermentação.



Através dos cálculos da velocidade específica de crescimento, substrato e produto, demonstraram que os carotenóides formados pela *Rhodotorula* CNPAT-02, comportaram-se como metabólitos primários, apresentando as mesmas tendências das curvas de crescimento e consumo de substrato.

5. AGRADECIMENTOS

A Embrapa agroindústria tropical pela realização experimental do projeto e ao CNPq por ter proporcionado a bolsa de estudos.

6. REFERÊNCIAS

BHOSALE, P.; JOGDAND, V. V.; GRADE, R. V.; Stability of β -carotene in spray dried preparation of *Rhodotorula glutinis* mutant 32. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 584-590, 2003.

COSTA, I. **Produção de β -caroteno por uma espécie do gênero *Rhodotorula***. Rio de Janeiro, RJ, 1992. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica) - Faculdade de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IAL: São Paulo, 1985. 3. ed. 533 p.

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

MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; ACHATZ, B. Effect of oxygen transfer rate on β -carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in shake flask

culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 687-694, 2005.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, R., Estrutura das células Procarióticas e Eucarióticas. **Microbiologia conceitos e aplicações**. São Paulo: MAKRON Books, 1996, v.1, p.124.

SCHMIDELL, W.; LIMA U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocologia Industrial**, 1ª Edição. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 2, 541 p.

SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. Métodos de coloração. **Microbiologia Básica**. Fortaleza: UFC, 1991, v. 2, p. 33-35.

SQUINA F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n. 3, p. 309-318, 2003.