



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

SABRINA ROBERTA SANTANA DA SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula* spp. EM SORO DE QUEIJO COALHO**

Recife

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

SABRINA ROBERTA SANTANA DA SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula* spp. EM SORO DE QUEIJO COALHO**

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE)

Co-orientadores:

Prof^a. Dr^a. Polyanna Nunes Herculano
(UNISÃO MIGUEL)

Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira (UFRPE)

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586p Silva, Sabrina Roberta Santana da
Potencial biotecnológico da produção de pigmentos carotenóides por *Rhodotorula* spp. em soro de queijo coalho / Sabrina Roberta Santana da Silva. - 2020.
120 f. : il.
- Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.
Coorientador: Polyanna Nunes Herculano.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. Atividades biológicas. 2. Fermentação submersa. 3. Levedura. 4. Subproduto lácteo. 5. Pigmentos naturais. I. Porto, Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Herculano, Polyanna Nunes, coorient. III. Título

CDD 636.089

SABRINA ROBERTA SANTANA DA SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula* spp. EM SORO DE QUEIJO COALHO**

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do grau de DOUTORA em Biociência Animal na área de Biotecnologia.

Aprovada pela comissão examinadora em: 28 / 02 / 2020.

Profª Drª Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE
Presidente

Profª Drª Márcia Nieves Carneiro da Cunha

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE
Membro Interno

Prof. Dra. Juanize Matias da Silva Batista

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE
Membro Interno

Profª Drª Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Departamento de Nutrição – UFPE
Membro Externo

Prof. Dra. Daniele Silva Ribeiro

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE
Membro Externo

Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira (suplente)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Dedico a Deus, aos meus pais Sandra Maria e José Roberto que sempre foram a minha fonte de inspiração, estímulo, força e o meu maior exemplo de resiliência e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à toda espiritualidade de luz pela grandiosa dádiva da vida, através da qual tenho sido agraciada pelas inúmeras oportunidades de crescer e me desenvolver pessoal, profissional e espiritualmente.

Aos meus pais, Sandra Maria e José Roberto, pela dedicação e amor incondicional sempre demonstrados ao longo da minha vida, incentivando e tornando o meu dia-a-dia mais caloroso e cheio de afeto.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto por ter me aceitado como orientanda quando “caí de paraquedas” me inscrevendo na sua linha de pesquisa para a seleção do doutorado. Pelos importantes ensinamentos e cuidado que confere não só a mim, mas a todos que fazem parte do Grupo Ana Porto.

À minha co-orientadora Dr^a Polyanna Nunes Herculano pela recepção e acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Vagne de Melo Oliveira pela ajuda com os estágios de docência em Bioquímica, bem como, pelas orientações para o bom desenvolvimento da tese e pela amizade.

À Leandro Fragoso (Best), Felype Rocha, Steliane Lima e Elaine Cristina, meus amigos do laboratório, pela amizade, pelos aperreios coletivos e parceria, pelo apoio nas análises de resultados importantes, além da capacidade de tornar essa jornada mais leve e mais divertida. À Gesilda Florenço, minha amiga e comadre, pelo incentivo de sempre e pela amizade.

A todos os amigos que fiz no LABTECBIO, a família científica que me recebeu de braços abertos, sendo agraciada pela convivência com pessoas espetaculares e muito generosas.

Aos amigos que fiz na Escola Heróis da Restauração pela generosidade e parceria, “Nenhum de nós é tão bom quanto todos juntos”.

À Prefeitura de Igarassu pela licença para estudo concedida na fase mais crítica e importante do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”.

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Estrutura dos carotenóides (a) xantofilas - zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina, respectivamente; (b) carotenos - neurosporeno, licopeno, betacaroteno e alfacaroteno, respectivamente.....16
- Figura 2.** Esquema simplificado da biossíntese de carotenóides.....17
- Figura 3.** Esquema de clivagem simétrica do betacaroteno em retinol.....18
- Figura 4.** Estrutura química dos carotenóides produzidos por *Rhodotorula* spp.: betacaroteno (I), toruleno (II) e torularrodina (III).....24
- Figura 5.** Biossíntese de carotenóides em *Rhodotorula* spp.....25

Capítulo 1

- Figura 1.** Cinética de crescimento das leveduras: *R. glutinis* URM 6683 em (a), *R. aurantiaca* URM 6687 em (b), *R. glutinis* URM 6691 em (c), *R. glutinis* URM 6692 em (d), *R. minuta* URM 6693 em (e) e *R. glutinis* URM 6695 em (f), sob condições operacionais padrão: 120 h de cultivo - CSQC = 90%, $T_{\text{inicial}} = 30^{\circ}\text{C}$, Agit. = 150 rpm.....62
- Figura 2.** Diagrama de interpretação geométrica da interação entre concentração do soro de queijo coalho (CSQC, %) e pH sob o consumo de lactose (S, g/L) pela levedura *Rhodotorula glutinis* URM 6692 após 24 horas de cultivo.....63

Capítulo 2

- Figura 1.** Cinética de consumo do radical DPPH frente ao extrato de pigmentos carotenóides obtidos de *Rhodotorula glutinis* URM6692 na concentração final de 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$72

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Rhodotorula</i> descritas na literatura como fonte de carotenóides.....	24
--	----

Capítulo 1

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes analisadas no planejamento experimental fatorial 2^3 (Box, Hunter & Hunter) para produção de carotenóides por <i>Rhodotorula</i> sp. em fermentação submersa.	57
Tabela 2. Composição centesimal dos macronutrientes e resíduo mineral fixo presentes no soro de queijo coalho do município de Garanhuns-PE.....	57
Tabela 3. Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 e resultados obtidos após 24 h de fermentação de <i>Rhodotorula glutinis</i> URM 6692 para a produção de biomassa, produção de carotenóides e rendimento específico.....	58
Tabela 4. Valores de produção de carotenóides totais obtidos por diferentes espécies de leveduras do gênero <i>Rhodotorula</i> utilizando fermentação submersa em meios de cultura comerciais e alternativos.....	59
Tabela 5. Efeitos estatísticos calculados para as respostas produção de biomassa (X), concentração de lactose consumida (S) e concentração volumétrica de carotenóides (CT) produzido por <i>Rhodotorula glutinis</i> URM 6692 utilizando soro de queijo coalho como substrato nas condições determinadas pelo design experimental 2^3	60

Capítulo 2

Tabela 1. Percentual médio de inibição apresentado pelo extrato de pigmentos carotenóides obtidos de <i>R. glutinis</i> URM 6692 (1,25 a 5,0 µg/mL) frente a quatro diferentes estirpes de bactérias patogênicas após 24 h do contato inicial.....	72
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	Absorvitividade específica
ADIs	Ingestões diárias aceitáveis
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
BS	Biomassa seca
C/N	Carbono/Nitrogênio
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração mínima inibitória
<i>crtI</i>	Fitoeno desaturase (formando neurosporeno)
<i>crtYB</i>	Licopeno Ciclase Bifuncional/Fitoeno sintase
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
C _{SQC}	Concentração do soro de queijo coalho
CT	Concentração de carotenóides Totais
DMAPP	Dimetilalil fosfato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DQO	Demanda química de oxigênio
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization
FDA/WHO	Food and Drug Administration/ World Health Organization
FES	Fermentação em estado sólido
FSm	Fermentação submersa
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IPP	Isopentenil fosfato
LAC (%)	Percentual de lactose
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC	Meio de cultivo
MEP	Via do metileritritol fosfato
MVA	Via do mevalonato

N.I.	Não informado
NCYC	National Collection of Yeast Cultures
P	Produção de metabólito (carotenóides)
RMF (%)	Percentual do Resíduo Mineral Fixo
rpm	Rotações por minuto
S	Concentração de lactose consumida
SQC	Soro de queijo coalho
TLC	Thin-Layer Chromatography
TP	Tempo de produção
URM	University Recife Mycologia
WAT	Tecido adiposo branco
WPC	Concentrado de proteínas do soro
X	Concentração da biomassa seca
$Y_{P/S}$	Rendimento produto/substrato (mg de carotenóides/g de lactose)
$Y_{P/X}$	Rendimento produto/biomassa (mg de carotenóides/g de biomassa)
%Lac	Percentual de lactose
%RMF	Percentual de resíduo mineral fixo

RESUMO

O gênero *Rhodotorula* é representado por microrganismos com reconhecida capacidade de sintetizar compostos biológicos de interesse industrial, com ação pró-vitamina A e as atividades antioxidante e antimicrobiana, por exemplo, que estão entre os benefícios à saúde. Deste modo, a associação entre a capacidade dos microrganismos de produzir biocompostos a partir de agroresíduos e a alta disponibilidade de resíduos produzidos pela indústria de laticínios pode contribuir para uma melhor eficácia da produção de metabólitos de interesse biotecnológico, como os carotenóides. Assim, este trabalho objetivou avaliar o potencial de produção de carotenóides por *Rhodotorula* spp. em fermentação submersa utilizando soro de leite derivado da produção de queijo de coalho (SQC) como substrato. Todas as leveduras (*R. aurantiaca* URM 6687, *R. glutinis* URM 6683, *R. glutinis* URM 6691, *R. glutinis* URM 6692, *R. glutinis* URM 6695 e *R. minuta* URM 6693) foram avaliadas quanto à produção de biomassa seca, consumo de lactose e a produção de carotenóides totais. O estudo foi desenvolvido em três etapas. Em todas elas, o SQC atuou como fonte única de carbono e nitrogênio, sob condições de cultivo previamente fixadas em 30°C, 150 rpm e 120 horas. Na primeira etapa, selecionou-se a levedura com melhor desempenho na produção de carotenóides totais em menor tempo. Na etapa seguinte, a levedura selecionada foi submetida a um planejamento fatorial 2^3 avaliando-se os efeitos das variáveis independentes: concentração do SQC (50, 75 e 100%), pH (4,5, 5,0 e 5,5) e agitação (100, 150 e 200 rpm), sob temperatura fixa (30 °C), tendo como respostas a produção de biomassa, carotenóides totais e o consumo de lactose, seus respectivos rendimentos específicos ($Y_{P/S}$), e a produtividade. Das leveduras avaliadas, *R. glutinis* URM 6692 foi selecionada por apresentar melhor desempenho para a produção de carotenóides totais, atingindo o rendimento ($Y_{P/X}$) de 509,26 mg/g e ($Y_{P/S}$) de 149,79 mg/g em 24 h, respectivamente. A melhor condição foi obtida em meio de cultura contendo 50% de SQC, pH 5,5 e 200 rpm, com produção de 69,32 mg/L de carotenóides totais, extraídos de 15,5 g/L de biomassa seca, adquirida a partir de um consumo de 8,16 g/L de lactose. Os pigmentos apresentaram um amplo espectro de atuação para atividade antimicrobiana, de modo que 2,5 µg de carotenóides (50 µg/mL) presentes no extrato foi suficiente para inibir o crescimento das bactérias avaliadas, alcançando 59,8% e 53,9% de inibição para bactérias gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 29665) e 54,5% e 51,3% para bactérias gram-positivas (*S. aureus* ATCC 6538 e *B. subtilis* ATCC 6633), respectivamente. De modo semelhante, os pigmentos foram concentrados (12,5 mg de carotenóides/mL) e avaliados quanto a atividade antioxidante apresentando uma capacidade de cerca de 62,5% para sequestrar radicais livres após 10 min de contato. Esses resultados demonstram que o ajuste das condições de cultivo foi eficiente de modo a garantir uma produção simultânea de carotenóides e biomassa, usufruindo de forma eficiente da produção biotecnológica quando do uso do SQC. Além disso, os pigmentos carotenóides produzidos por *R. glutinis* URM 6692 nestas condições apresentam qualidades adequadas para possível uso como aditivo alimentar natural alternativo.

Palavras-chave: Atividades biológicas, Fermentação submersa, Levedura, Subproduto lácteo, Pigmentos naturais,

ABSTRACT

The *Rhodotorula* genus is represented by microorganisms with known ability to synthesize biological compounds of industrial interest, with pro-vitamin A action and antioxidant and antimicrobial activities, for example, which are among the health benefits. Thus, the association of the ability of microorganisms to produce biocomposites from agro-residues and the high availability of residues produced by the dairy industry can contribute to a better efficiency in the production of metabolites of biotechnological interest, such as carotenoids. This work aimed to assess the carotenoids production potential of *Rhodotorula* in submerged fermentation using whey derived from the production of rennet cheese (SQC) as a substrate. All yeasts (*R. aurantiaca* URM 6687, *R. glutinis* URM 6683, *R. glutinis* URM 6691, *R. glutinis* URM 6692, *R. glutinis* URM 6695 and *R. minuta* URM 6693) were evaluated for dry biomass production, lactose consumption and total carotenoids production. The study was developed in three stages. In all of them, the SQC acted as a single source of carbon and nitrogen, under cultivation conditions previously fixed at 30 °C, 150 rpm and 120 hours. In the first stage, the yeast with the best performance in the production of total carotenoids in less time was selected. In the next step, the selected yeast was subjected to a factorial design 2³ evaluating the effects of the independent variables: concentration of SQC (50, 75 and 100%), pH (4.5, 5.0 and 5.5) and agitation (100, 150 and 200 rpm), under fixed temperature (30 °C), with the production of biomass, total carotenoids, lactose consumption, their respective specific yields ($Y_{P/S}$), and productivity as responses. Among the assessed yeast, *R. glutinis* URM 6692 was selected due to its performance in the production of carotenoids, reaching a yield ($Y_{P/X}$) of 509.26 mg/g and ($Y_{P/S}$) of 149.79 mg/g in 24 h, respectively. The best culture medium conditions were 50% SQC, pH 5.5 and 200 rpm, which resulted in the production of 69.32 mg/L of total carotenoids extracted from 15.5 g/L of dry biomass, obtained from the consumption of 8.16 g/L of lactose. The pigments showed a broad spectrum of antimicrobial activity, so that 2.5 µg of carotenoids (50 µg/mL) in the extract was sufficient to inhibit the growth of the evaluated bacteria, reaching 59.8% and 53.9% inhibition for gram-negative bacteria (*E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 29665) and 54.5% and 51.3% for gram-positive bacteria (*S. aureus* ATCC 6538 and *B. subtilis* ATCC 6633), respectively. Similarly, the pigments were concentrated (12.5 mg carotenoids/mL) and evaluated for antioxidant activity showing a capacity of about 62.5% to scavenge free radicals after 10 min of contact. These results demonstrate that the adjustment of the culture conditions was efficient to guarantee carotenoids and biomass production simultaneously, making efficient use of the biotechnological production when using SQC. Furthermore, carotenoid pigments produced by *R. glutinis* URM 6692 under these conditions exhibit qualities suitable for possible use as an alternative natural food additive.

Keywords: Biological activities, Dairy waste, Natural pigments, Submerged fermentation, Yeast.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Carotenóides.....	16
2.2 Bioprocessos para a produção de carotenóides.....	20
2.3 Produção de carotenóides por <i>Rhodotorula</i> spp.....	22
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1 – Uso alternativo do soro de queijo coalho para a produção de carotenóides por <i>Rhodotorula glutinis</i> URM 6692.....	35
RESUMO.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO 2 – Avaliação das propriedades antimicrobianas, antioxidantes e toxicidade de carotenóides produzidos por <i>Rhodotorula glutinis</i> para potencial aplicação na composição de ração animal.....	64
RESUMO.....	65
INTRODUÇÃO.....	66
MATERIAL E MÉTODOS.....	69
RESULTADOS	72
DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÃO	76
AGRADECIMENTOS	76
CONFLITO DE INTERESSES.....	76
REFERÊNCIAS.....	76
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
ANEXOS.....	82

1. INTRODUÇÃO

Constantemente relacionados à cor apresentada por alimentos de origem vegetal, os carotenóides são pigmentos isoprenóides da classe dos tetraterpenos, com coloração rica que pode variar do amarelo ao vermelho, sendo também encontrados em animais e micro-organismos (CHENG YANG, 2015). Diversas espécies de micro-organismos apresentam uma habilidade natural para produzir carotenóides. Dentre eles, estão algas unicelulares, cianobactérias, algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos (incluindo leveduras e fungos filamentosos) (MEZZOMO; FERREIRA, 2016). O interesse pelos carotenóides está relacionado aos efeitos benéficos que conferem à saúde humana e animal, sendo relacionados ao seu consumo regular (CHENG; YANG, 2016; ROSAS et al., 2019).

Sua utilização como corante, bem como, os benefícios ligados aos carotenóides, como a atividade pro-vitamina A e sua interessante capacidade antioxidante, antimicrobiana e inclusive, antitumoral, tem motivado o consumo destes pigmentos em detrimento daqueles quimicamente sintetizados. Desta forma, para suprir a necessidade do mercado, o desenvolvimento de estratégias de extração e obtenção de carotenóides, de forma rápida e segura para o meio ambiente tem se intensificado, em especial, aquelas relacionadas à produção biotecnológica destes pigmentos por via microbiana (DOS SANTOS et al., 2015; MEZZOMO; FERREIRA, 2016; BARONE et al., 2018; TOTI et al., 2018; YOUNG et al., 2018).

Além das ferramentas de engenharia genética, o controle e o ajuste das condições de cultivo, assim como, a utilização de substratos agroindustriais ricos em nutrientes, tem sido algumas das alternativas empregadas para reduzir os custos na síntese de carotenóides, como o β -caroteno, por micro-organismos através de processos fermentativos (MATA-GÓMEZ et al., 2014; UENOJO; PASTORE, 2010). Leveduras do gênero *Rhodotorula* são reconhecidas como boas produtoras de carotenóides (BUZZINI et al., 2007; MOLINÉ et al., 2012).

Assim, uso do soro de queijo em processos biotecnológicos aplicados à produção de substâncias bioativas de alto valor agregado, como o bioetanol (MURARI et al., 2019), enzimas (BOSSO et al., 2019), peptídeos bioativos do soro (DULLIUS et al., 2018) e carotenóides (RIBEIRO et al., 2017), por exemplo, podem contribuir para a movimentação de recursos, tornando o seu uso atrativo para a

indústria de maneira geral. Assim, pesquisas que busquem viabilizar a produção de carotenóides a baixo custo são amplamente incentivadas pelo mercado global de produtos biotecnológicos. Nesta perspectiva, este estudo visa avaliar a produção e a bioatividade de carotenóides produzidos por leveduras do gênero *Rhodotorula* em fermentação submersa tendo o soro de leite derivado da produção de queijo coalho como principal fonte de nutrientes.

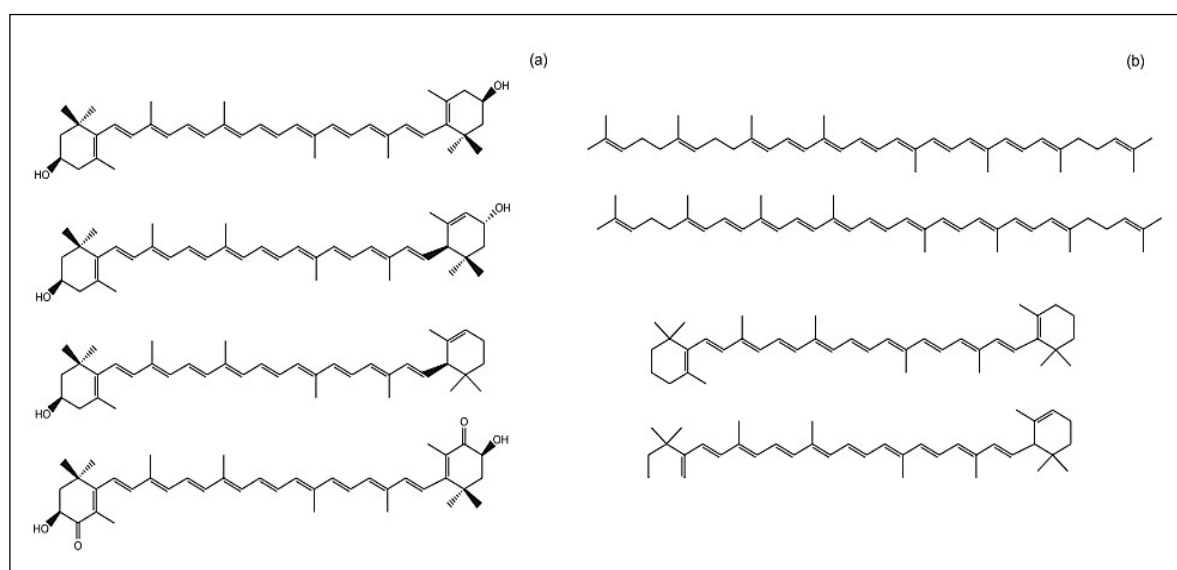
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carotenóides

Carotenóides são pigmentos naturais mundialmente utilizados, já tendo sido identificados e extraídos em animais, plantas e micro-organismos (algas, bactérias, fungos) (CHENG; YANG, 2016). Basicamente formados por uma cadeia carbônica poliênica contendo 40 carbonos, os carotenóides são quimicamente conhecidos como pigmentos terpenóides e são responsáveis pela cor de uma grande variedade de alimentos (HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014; MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Divide-se em dois grandes grupos, que podem conter ou não estruturas cíclicas nas suas extremidades, os carotenos e as xantofilas (Figura 1). Betacaroteno e toruleno são exemplos clássicos de carotenos, uma vez que apresentam apenas carbono e hidrogênio em sua estrutura química. Todavia, as xantofilas diferem deles por apresentar radicais oxigenados na sua estrutura, como astaxantina e cantaxantina (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014; HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014; MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

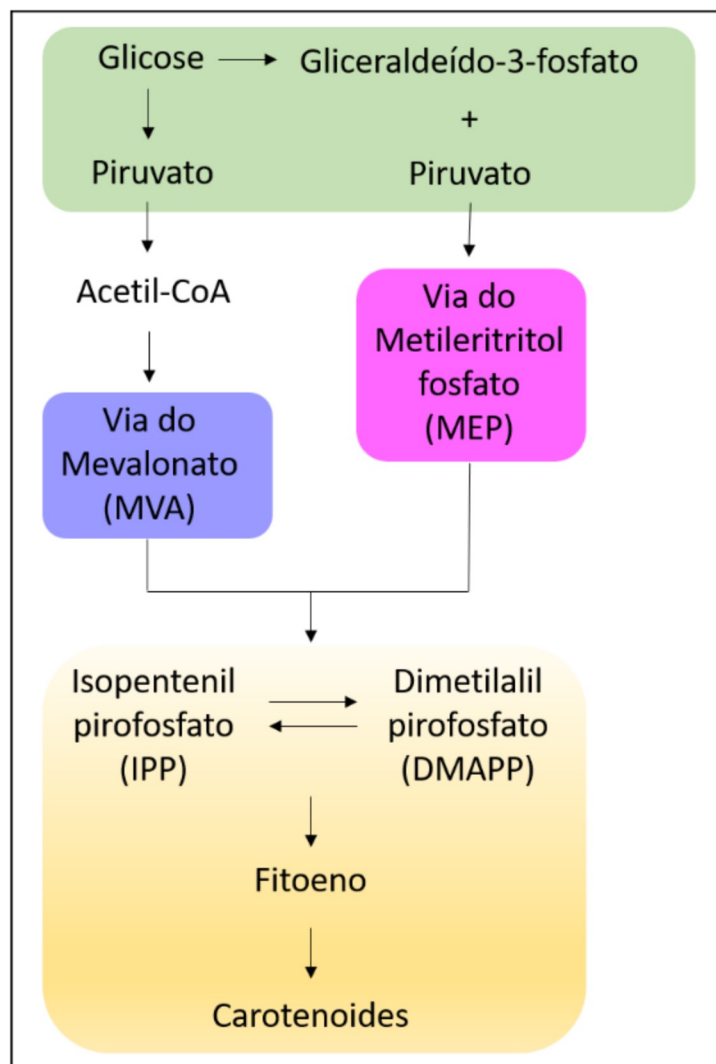
Figura 1. Estrutura dos carotenóides: (a) xantofilas - zeaxantina, luteína, criptoxantina e astaxantina, respectivamente; (b) carotenos - neurosporeno, licopeno, betacaroteno e alfacaroteno, respectivamente.



Fonte: VALDUGA (2009)

A biossíntese de carotenóides e outros terpenoides é resultante da formação de blocos de isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (XIAO et al., 2019). De acordo com Mesquita et al. (2017), na natureza, os carotenóides podem ser biossintetizados tanto por meio da via do mevalonato (MVA) que depende da produção de IPP oriundo de acetil Coenzima A; como da via do metileritritol fosfato (MEP), que utiliza piruvato para a obtenção IPP e DMAPP (Figura 2).

Figura 2. Esquema simplificado da biossíntese de carotenóides.

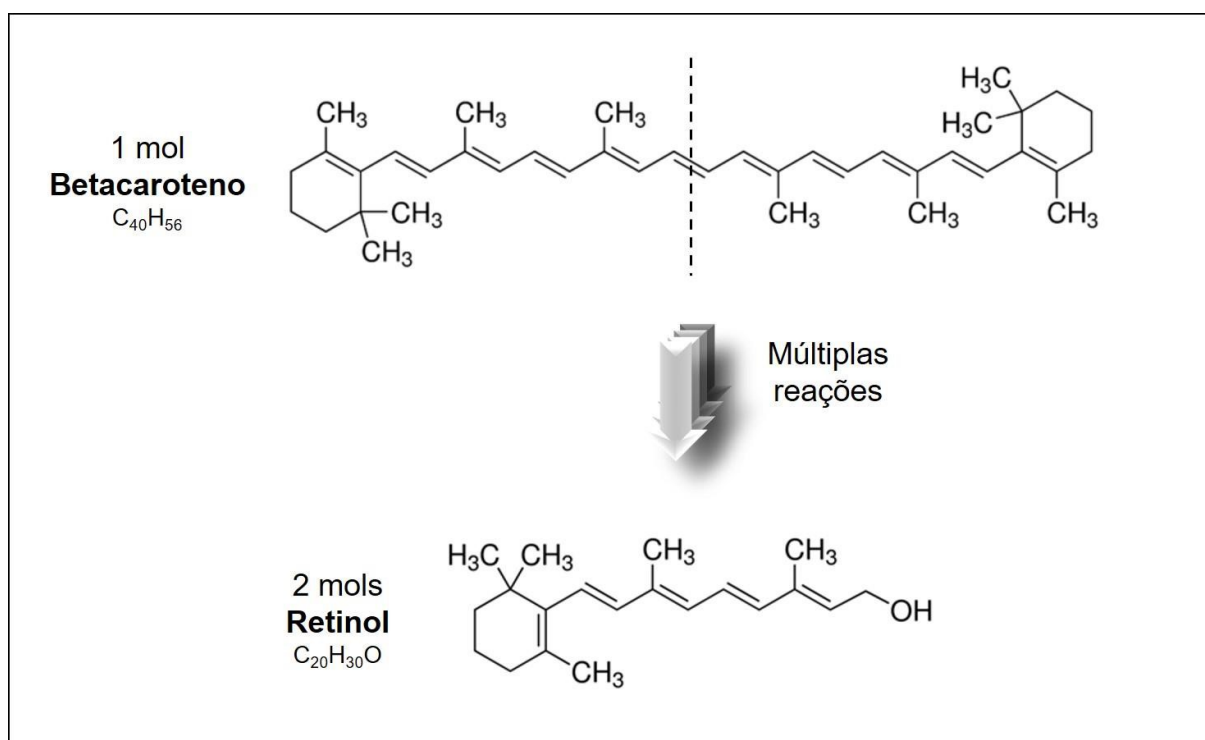


Fonte: Adaptado de XIAO et al. (2019).

Nos últimos anos, a capacidade de síntese de carotenóide por micro-organismos tem sido avaliada por vários estudos, em espécies de fungos filamentosos como *Monascus* sp. (TORRES et al., 2016) e *Blakeslea trispora*

(DUFOSSE, 2006), assim como pelas leveduras, em especial as leveduras vermelhas oleaginosas, dentre elas destacam-se *Rhodospiridium toruloides* (BUZZINI *et al.*, 2007), *Sporidiobolus* sp. (AVALOS; CARMEN LIMON, 2015), bem como várias espécies do gênero *Rhodotorula* sp. (KIRTI *et al.*, 2014). O desempenho apresentado por espécies do gênero *Rhodotorula* em pesquisas realizadas com substratos de baixo custo vem sendo avaliado ao longo dos anos para a produção de carotenóides visando tornar o processo mais barato e sustentável. Glicerol proveniente da produção de biodiesel, água residual de batata, desproteinizada, farelo de arroz, farelo de trigo, bagaço e melaço de cana-de-açúcar, casca de cebola, pele de batata, casca de feijão mungo, vagem de ervilha, bolo de óleo de coco, bolo de óleo de gergelim, semente de tamarindo, torta de amendoim, bagaço de mandioca, entre outros resíduos da agroindústria são alguns dos exemplos utilizados (SHARMA; GHOSHAL, 2020; KOT *et al.*, 2019; HUSSEINY *et al.*, 2018; MANIMALA; MURUGESAN, 2017).

Figura 3. Esquema de clivagem simétrica do betacaroteno em retinol.



Fonte: A autora.

Dessa forma, os carotenóides têm recebido a atenção das indústrias farmacêutica e alimentícia com o objetivo de atender suas demandas, seja pela sua

atividade antioxidante e pró-vitamina A, assim como por associar valor nutricional aos alimentos, melhorar a qualidade de suplementos e atuar como aditivos alimentares (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014; CHANCHAY *et al.*, 2012; FRENGOVA; BESHKOVA, 2009). Alfacaroteno, betacriptoxantina e betacaroteno são três importantes precursores de vitamina A, com destaque para o betacaroteno, cuja clivagem de uma molécula resulta em duas moléculas de retinol (Figura 3) (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014; AMBRÓSIO, 2006).

É importante salientar que os carotenóides exercem efeitos benéficos ao organismo humano. Evidências epidemiológicas e resultados experimentais confirmam que uma dieta rica em carotenóides inibe e/ou pode minimizar consideravelmente a ocorrência de doenças relacionadas aos radicais livres como a arteriosclerose (e outras doenças cardiovasculares) e câncer, catarata e degeneração macular relacionada a idade, esclerose múltipla e envelhecimento precoce (WOODSIDE *et al.*, 2015; EL-BANNA *et al.*, 2012; FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

De acordo com a BCC Research (2008), em 2007 o mercado global de carotenóides movimentou US\$ 766 milhões e a expectativa para 2015 era de US\$ 919 milhões. Contudo, ainda em 2014 atingiu a marca de US\$ 1,5 bilhões (BCC Research, 2015). Os dados demonstram que os lucros obtidos foram maiores que o esperado, de forma que o mercado global de carotenóides se manteve aquecido e que os dados projetados para 2022 podem ser muito mais prósperos que os US\$1,7 bilhões esperados pela Global Industry Analysts (2016). Para especialistas da BCC Research (2018), neste mesmo ano o mercado global de carotenóides pode chegar a US\$ 2,0 bilhões caso mantenha uma taxa de crescimento anual médio de 5,7% no período de 2017 a 2022.

A tendência de crescimento e expansão deste mercado é perceptível e está diretamente relacionada aos benefícios associados à saúde humana e animal. Assim, a disposição da população mundial em gastar com produtos de saúde preventiva pode servir de incentivo para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas que permitam a produção de pigmentos carotenóides de origem natural visando atender a esta demanda (Global Industry Analysts, 2016).

2.2 Bioprocessos para a produção de carotenóides

Dentre os pigmentos mais utilizados no mundo estão os carotenóides que, além das cores exuberantes que vão do amarelo ao vermelho (CHENG; YANG, 2016), podem apresentar funções bioativas capazes de propiciar efeitos benéficos ao organismo (MARTINS et al., 2016). Associado às constantes buscas por melhoria da saúde e da qualidade de vida, muitos estudos têm se dedicado a desenvolver métodos de produção de carotenóides que sejam eficazes e que possam resultar em maior produtividade. A produção microbiana de carotenóides tem recebido grande incentivo, em virtude da redução dos custos de produção relacionados ao uso de substratos de baixo custo (MATA-GÓMEZ et al., 2014).

Os processos fermentativos microbianos, também conhecidos como bioprocessos, têm utilizado uma grande variedade de substratos de baixo custo na produção de carotenóides, utilizando desde resíduos agroindustriais como melaço de cana-de-açúcar, açúcar de melaço de beterraba, glicerol residual, soro de leite, resíduos sólidos de café; resíduos de alimentos como os resíduos de pão e de ketchup, águas residuais e efluentes domésticos, são alguns exemplos. Estes substratos fornecem nutrientes, suprimindo as necessidades mínimas necessárias para promover o crescimento do micro-organismo, bem como, a produção do bioativo desejado (CHENG; YANG, 2016; CARDOSO et al., 2016; KOT et al., 2017; ÚBEDA et al., 2017; MOREIRA et al., 2018; GMOSER et al., 2018; RIOS et al., 2018).

Derivado da produção de queijo coalho, o soro de leite é rico em componentes orgânicos, apresentando-se como um líquido de coloração amarelo-esverdeada, que possui em sua composição lactose, proteínas, vitaminas e sais minerais, além de cerca da metade dos sólidos presentes na solução (BARBOSA et al, 2010; BALDASSO et al., 2011; FAO, 2013). A problemática envolvendo o soro de queijo está no fato de ser um produto com alta demanda química de oxigênio (DQO = 50-80g/L), podendo se comportar como uma importante fonte de degradação do meio ambiente (CARVALHO et al., 2013).

Do ponto de vista econômico, a veiculação do soro para ser utilizado em outros processos industriais pode resultar em uma interessante receita para o produtor. Contudo, na agricultura familiar, ainda é comum que seja descartado de forma inadequada, comportando-se como um resíduo ameaçador em virtude da natureza orgânica. Ações adequadas para o gerenciamento deste resíduo têm sido

incentivadas através do desenvolvimento de alternativas inovadoras que permitam baratear os custos para a separação, tratamento e/ou sua reutilização, evitando a degradação ambiental (BARBOSA *et al.*, 2010; YADAV *et al.*, 2015).

A composição de alimentos como as bebidas lácteas (SIQUEIRA *et al.*, 2013), a obtenção do concentrado de proteínas do soro (WPC – “whey protein concentrate”) (YADAV *et al.*, 2015) ou ainda o uso do soro em processos biotecnológicos como a fermentação submersa (FSm) aplicados à produção de substâncias bioativas de alto valor agregado (PANESAR *et al.*, 2015), como o bioetanol (MURARI *et al.*, 2019), enzimas (BOSSO *et al.*, 2019), peptídeos bioativos do soro (DULLIUS *et al.*, 2018) e carotenóides (RIBEIRO *et al.*, 2017), por exemplo, são algumas das estratégias desenvolvidas para o amplo aproveitamento do soro.

O tipo de resíduo, sua natureza física e o metabólito desejado são variáveis que irão determinar inicialmente a técnica de fermentação que será utilizada, sendo a fermentação submersa (FSm) o tipo aplicado aos substratos de natureza líquida como o soro de queijo e a fermentação em estado sólido (FES) aquela empregada nos processos que utilizam resíduos sólidos, como o bagaço de cana, por exemplo. Ambos os processos podem ser aplicados para a produção de pigmentos carotenóides (YADAV *et al.*, 2015).

Na fermentação submersa, a produção de biomassa e bioativos pode variar de acordo com o tamanho da escala pretendida (laboratorial, piloto ou industrial), utilizando frascos agitados ou ainda biorreatores. A escolha da escala e do tipo de processo (contínuo, descontínuo ou descontínuo-alimentado) é considerada importante ao se produzir carotenóides por via microbiana (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Para o estabelecimento do processo de produção de carotenóides e outros compostos microbianos, bem como para a sua realização, se faz necessário o controle das condições de cultivo que podem contribuir com o crescimento da estirpe microbiana escolhida e o rendimento dos produtos ao final do processo. Temperatura, pH, aeração ou agitação (taxa de oxigênio dissolvido) e o tempo do processo são alguns dos fatores que podem determinar o sucesso de um bioprocessos, sobretudo naqueles realizados em biorreatores, assim como quando aliados a escala, ao tipo do processo e ao tipo e concentração do substrato previamente escolhidos (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Em relação ao micro-organismo produtor, este pode ser de linhagem selvagem ou geneticamente modificada, a escolha do micro-organismo é o fator mais relevante de toda a fermentação, pois é a partir das suas reações metabólicas frente às condições do processo que ocorrerá a biossíntese dos produtos-alvo. Inúmeras espécies microbianas são conhecidas por apresentar a habilidade natural para sintetizar carotenóides. É o caso de bactérias como *Rhodobacter sphaeroids* (LIU et al., 2015) e *Micrococcus roseus* (ROSTAMI et al., 2016), leveduras como *Rhodotorula glutinis* (YOO et al., 2016), *Rhodospiridium* (DIAS et al., 2015; FREITAS et al., 2014), *Phaffia* (NANGIA et al., 2016; XIAO et al., 2015; RIOS et al., 2015) e *Sporobolomyces* (CARDOSO et al., 2016; PENNACCHI et al., 2014), fungos filamentosos como *Mucor circinelloides* (CSERNETICS et al., 2011) e *Blakeslea trispora* (PAPAIOANNOU; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2012) ou ainda por algas unicelulares como a *Spirulina platensis* (ISMAIEL et al., 2016) e *Dunaliella salina* (XU; HARVEY., 2019), que são intensamente estudados visando sua aplicação em bioprocessos de larga escala.

Em razão de sua natureza unicelular e elevada taxa de crescimento em substratos de baixo custo com alto teor de açúcares, as leveduras são mais adequadas para a produção de metabólitos em larga escala se comparadas às algas e aos fungos. Devido às particularidades atribuídas a esses micro-organismos, as leveduras são tidas como seres industrialmente interessantes (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009; MEZZOMO; FERREIRA, 2016).

2.3 Produção de carotenóides por *Rhodotorula* spp.

O gênero *Rhodotorula* (YOO et al., 2016; YEN et al., 2016; ZHANG et al., 2014), destaca-se por apresentar espécies de leveduras produtoras de pigmentos carotenóide em condições naturais. *Rhodotorulas* são capazes de metabolizar polissacarídeos e glicerina presentes em resíduos agroindustriais, convertendo-os em lipídeos e carotenóides, evidenciando assim o seu relevante potencial biotecnológico (MEZZOMO; FERREIRA, 2016; YEN et al., 2012; SAENGE et al., 2011).

Classificadas taxonomicamente como basidiomicetos anamórficos, as leveduras do gênero *Rhodotorula* agrupam-se nos subfilos Pucciniomycotina e Ustilagomycotina, compreendendo 43 espécies (29 espécies oriundas da classe

Microbotryomycetes e outras 14 da classe Cystobasidiomycetes) e três espécies, respectivamente (SAMPAIO, 2011). Este gênero é formado por leveduras aeróbicas estritas, caracteristicamente produtoras de glicogênio na fase exponencial de crescimento (fase log), sendo importantes fontes de proteína. *Rhodotorula* spp. são amplamente conhecidas pela capacidade de produção de metabólitos secundários com alto valor agregado durante a fase estacionária de crescimento, como lipídeos e pigmentos carotenóides (TKÁČOVÁ *et al.*, 2015; HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2014), de modo que são conhecidas como leveduras vermelhas oleaginosas. Vários autores relataram a produção de carotenóides por espécies do gênero *Rhodotorula* (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies do gênero *Rhodotorula* descritas na literatura como fonte de carotenóides.

<i>Rhodotorula</i>	Fonte de Carbono (fermentação)	Carotenóides produzidos e identificados	Método de determinação e quantificação do carotenóide	Referências
	Glicose	Betacaroteno Torularrodina Toruleno	Cromatografia Líquida de Alta Densidade (HPLC)	Braundwald <i>et al.</i> (2013)
<i>R. glutinis</i>	Melaço de cana de açúcar	Toruleno	Cromatografia de Camada Delgada (CCD/TLC) Espectrofotometria	El-Banna <i>et al.</i> (2012)
	Glicerol bruto	Betacaroteno	Espectrofotometria	Saenge <i>et al.</i> (2011)
	Resíduos de alimentos (resíduo de ketchup e melaço de cana de açúcar)	Betacaroteno Torularrodina Toruleno	Cromatografia em Camada Delgada (CCD/TLC) Espectrofotometria	Cheng; Yang (2016)
<i>R. mucilaginosa</i>	Glicerol bruto e água do mar	Betacaroteno	N.I.*	Yen <i>et al.</i> (2016)
	Glicose	Toruleno	Espectrofotometria	Maldonado <i>et al.</i> (2012)
	Glicose	Betacaroteno	Cromatografia Líquida de Alta Densidade (HPLC)	Mihalcea <i>et al.</i> (2015)
<i>R. rubra</i>	Suco, melaço e xarope de cana de açúcar	Betacaroteno	Cromatografia em Camada Delgada (CCD/TLC) Espectrofotometria	Banzatto <i>et al.</i> (2013)

* Não informado.

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são amplamente distribuídas na natureza e podem sintetizar carotenóides específicos, tais como betacaroteno, toruleno e torularrodina (Figura 4), em proporções diferentes, a depender da espécie, dos constituintes do meio e das condições ambientais (MATA-GOMÉZ *et al.*, 2014; EL-BANNA *et al.*, 2012). Neste gênero, a biossíntese de carotenóides (Figura 5), que se inicia por intensas condensações de unidades de isoprenos, desencadeia na formação do fitoeno (um carotenóide incolor). A partir daí, uma sequência de desidrogenações, controladas pelo gene *crtI*, e o estabelecimento de duplas ligações ao longo da cadeia leva a formação de neurosporeno seguido de licopeno. Assim, duas rotas mediadas pelo gene *crtYB* levam a formação de γ -caroteno que, em seguida originará β -caroteno; e, a formação de toruleno, que ao ser hidroxilado e oxidado resultará em uma unidade de torularrodina (TANG *et al.*, 2019). De acordo com Davoli *et al.* (2004) e Aksu; Eren (2007), a quantidade de carotenóides produzidos por leveduras deste gênero será considerada baixa, média ou elevada quando o rendimento for menor que 100 $\mu\text{g/g}$, de 101 - 505 $\mu\text{g/g}$ e maior que 500 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Figura 4. Estrutura química dos carotenóides produzidos por *Rhodotorula* spp.: betacaroteno (I), toruleno (II) e torularrodina (III).

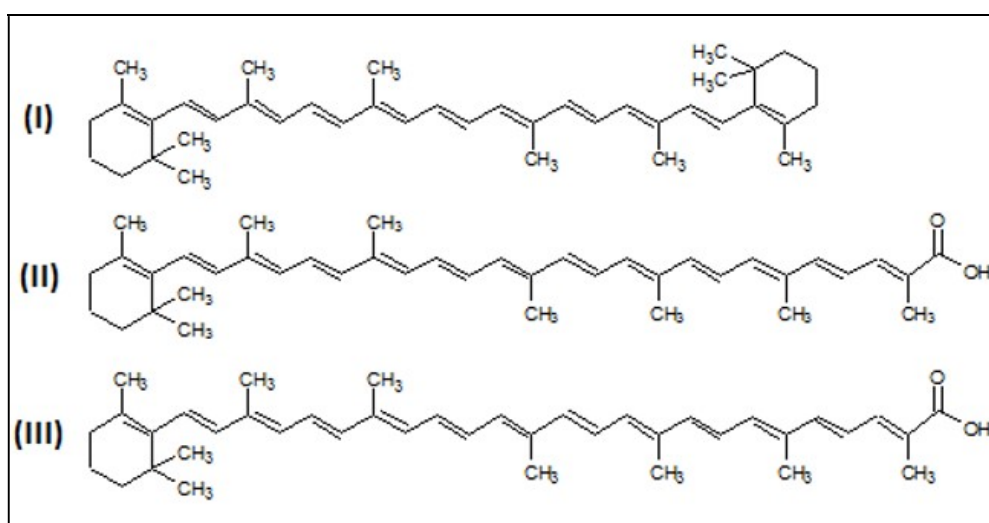
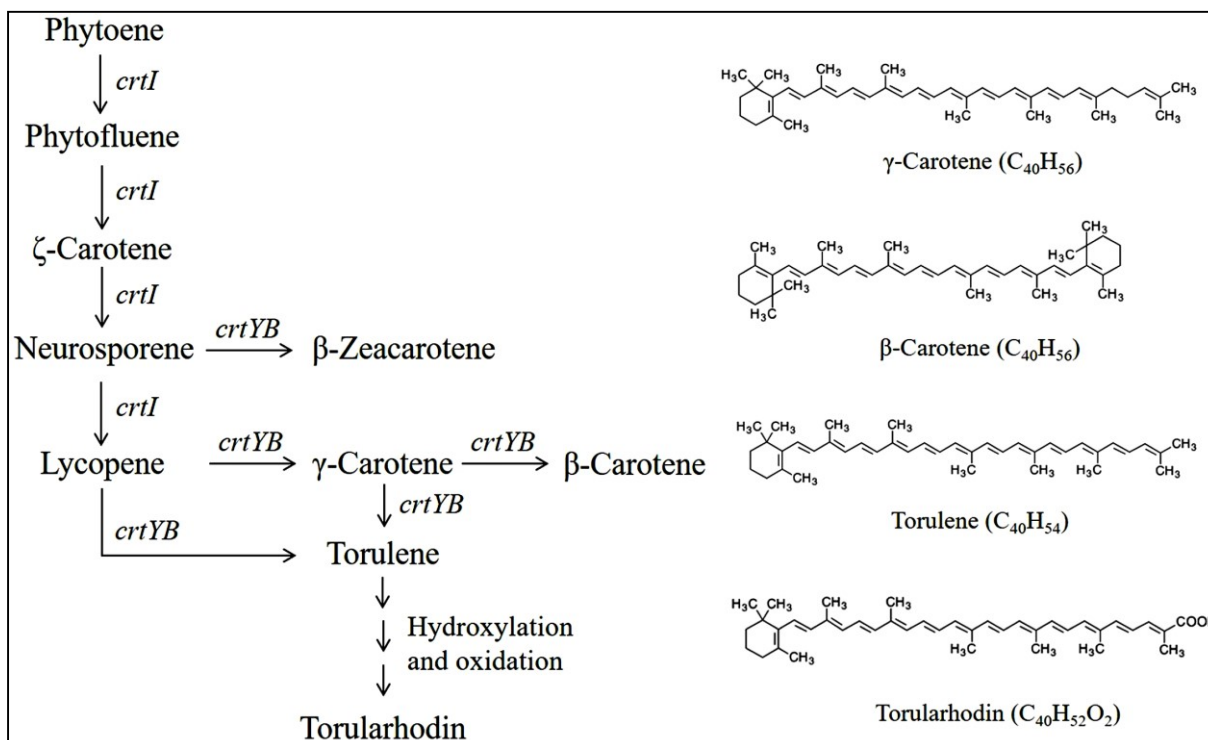


Figura 5. Biossíntese de carotenóides em *Rhodotorula* spp.



Fonte: TANG et al. (2019)

Considerada a espécie típica do gênero *Rhodotorula*, *R. glutinis* apresenta alta capacidade de sintetizar lipídeos, carotenóides e enzimas – metabólitos úteis para a indústria. Em virtude do seu potencial biotecnológico e por não oferecer riscos à saúde humana, essas leveduras aumentam o rendimento dos processos, de forma a apresentar ampla aplicação na indústria de alimentos (KOT *et al.*, 2016; TKÁČOVÁ *et al.*, 2015).

El-Banna *et al.* (2012) relataram que fatores como as fontes de carbono e nitrogênio, razão C/N, sais minerais e temperatura, são fundamentais para determinar as condições ótimas de produção de biomassa e carotenóide por *R. glutinis* var. *glutinis*. Esses mesmos fatores têm sido analisados em vários outros estudos que buscam descobrir formas de produzir estes pigmentos que sejam sustentáveis e de baixo custo, reduzindo custos de produção através do uso de resíduos da agroindústria da cana de açúcar, tal como os trabalhos de Cheng; Yang (2016), Banzatto *et al.* (2013) e Aksu; Eren (2005), de combustíveis de origem vegetal (produção de biodiesel) como as pesquisas de Saenge *et al.* (2011) e Yen *et al.* (2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de carotenóides por leveduras do gênero *Rhodotorula* através de fermentação submersa, utilizando o soro do queijo de coalho como substrato.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização físico-química do soro de queijo de coalho;
- Analisar o crescimento das leveduras do gênero *Rhodotorula* no soro do queijo de coalho na escala laboratorial em frascos agitados;
- Selecionar a levedura com melhor produção de carotenóides;
- Extrair os pigmentos produzidos na biomassa das leveduras;
- Avaliar a influência da fonte de carbono/nitrogênio mais adequada para o crescimento das leveduras no soro de queijo de coalho;
- Avaliar o efeito das variáveis independentes: concentração do soro, pH e agitação, conforme planejamento fatorial completo 2^3 sob a produção de carotenóides;
- Analisar os parâmetros cinéticos de crescimento microbiano (X), consumo do substrato (S) e produção do metabólito – carotenóides (P);
- Investigar o potencial antimicrobiano e antioxidante dos pigmentos produzidos.

4. REFERÊNCIAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107-113, 2007.

AKSU, Z. EREN, A. T. Carotenoids production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2985-2991, 2005.

AMORIM-CARRILHO, K. T., et al. Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49-73, 2014.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

AVALOS, J.; CARMEN-LIMÓN, M. Biological roles of fungal carotenoids. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 309-324, 2015.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.

BANZATTO, D.; FREITA, L.A.; MUTTON, M.J.R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane, molasses, and syrup. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 14-18, 2013.

BARBOSA, A. S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde**, v.5, n.1, p.7-25, 2010. Disponível em: <<http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/download/240/240>>. Acesso em: 11 set. 2019.

BARONE et al. Antitumoral potential, antioxidant activity and carotenoid content of two Southern Italy tomato cultivars extracts: San Marzano and Corbarino. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 2, p.1266-1277, 2018.

BCC RESEARCH (2008). BCC Research Report Overview: The Global Market for Carotenoids. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-market-fod025c.html>>. Acesso em: 11 set. 2019.

BCC RESEARCH (2015). BCC Research Report Overview: The Global Market for Carotenoids. Disponível em: < <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html>>. Acesso em: 11 set. 2019.

BCC RESEARCH (2018). BCC Research Report Overview: The Global Market for Carotenoids. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>>. Acesso em: 11 set. 2019.

BOSSO, A. et al. Substrate consumption and beta-galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019.

BRAUNDWALD, T. et al. Effect of different C/N-ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applies Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6581-6588, 2013.

BUZZINI, P. et al. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus*. **Microbiology**, v. 53, p. 1024-1031, 2007.

CARDOSO, L., et al. Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 374-379, 2016.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CHANCHAY, N. et al. Optimal Conditions for Carotenoid Production and Antioxidation Characteristics by *Rhodotorula rubra*. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 6, n. 8, p. 621-625, 2012.

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

CSERNETICS, A., et al. Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 7, p. 696-703, 2011.

DAVOLI, P.; MIERAU, V.; WEBER, R.W.S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemical Microbiology**, v. 40, p. 392-397, 2004.

DIAS, C., et al. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 309-318, 2015.

DOS SANTOS, R.; PIMENTA-FREIRE, G.; DIAS-SOUZA, M. V. Carotenoids and flavonoids can impair the effectiveness of some antimicrobial drugs against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 5, p. 1777–1782, 2015.

DUFOSSE, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313-321, 2006.

DULLIUS, A.; GOETTERT, M.I.; SOUZA, C.F.V. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods—Biotechnological facilitation of industrial scale-up. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 58-74, 2018.

EL-BANNA, A. A., EL-RAZEK, A. M. A., EL-MAHDY, A. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 64-71, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION. Milk and dairy products in human nutrition. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>. Acessado em 26 fev. 2020.

FREITAS, C. et al. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 355–359, 2014.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 163-180, 2009.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC. MCP-1700: CAROTENOIDS – A global strategic business report. July 2016: Press Release. Disponível em <<http://www.strategyr.com/pressMCP-1700.asp>>. Acesso em 17 jul 2016.

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

HUSSEINY, S. M. et al. Optimization of b-Carotene Production from *Rhodotorula glutinis* ATCC 4054 Growing on Agro-industrial Substrate Using Plackett–Burman Design. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 88, n. 4, p. 1637-1646, 2018.

ISMAIEL, M. M. S.; EL-AYOUTY, Y. M.; PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 298-304, 2016.

KIRTI, K. et al. Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. **Advances in Biology**, v. 2014, n. 1, p. 1-13, 2014.

KOT, A. M. et al. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, p. 6103–6117, 2016.

KOT, A. M., et al. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 25-31, 2017.

KOT, A. 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**, v. 35, n. 157, 2019, 10p.

LIU, S., et al. Enhancement of *Rhodobacter sphaeroides* growth and carotenoid production through biostimulation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 33, p. 21-28, 2015.

MALDONADE, I.R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; SCAMPARINI, A.R.P. Statistical optimization of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 109-115, 2012.

MANIMALA, M. R. A.; MURUGESAN, R. Studies on carotenoid pigment production by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cheap materials of agro-industrial origin. **The Pharma Innovation**, v. 6, n. 1, p. 80-82, 2017.

MARTINS, N. et al. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agroindustries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 1-15, 2016.

MATA-GÓMEZ, L.C. et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 1-12, 2014.

MESQUITA, S.; TEIXEIRA, C.; SERVULO, E. Carotenoids: Properties, Applications and Market. **Revista Virtual de Química**, p. 672-688, 2017.

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

MIHALCEA, A., et al. Extraction of Torularhodin from *Rhodotorula rubra* Yeast Using Sunflower Oil. **Revista de Chimie**, v. 66, n. 10, 2015.

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

MOREIRA, M. D., et al. Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. **Waste Management**, v. 82, p. 93-99, 2018.

MURARI, C. S. et al. Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101-182, 2019.

NANGIA, H. et al. Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* for astaxanthin production. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 63-68, 2016.

PANESAR, R.; KAHUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.

PAPAIIOANNOU, E. H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Agro-food wastes utilization by *Blakeslea trispora* for carotenoids production. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 1, p. 151-153, 2012.

PENNACCHI, M. G. C. et al. A comparison of cell disruption procedures for the recovery of intracellular carotenoids from *Sporobolomyces ruberrimus* H110. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 6, n. 1, p. 136-143, 2014.

RIBEIRO, J. E. et al. Production of *Chlorella protothecoides* biomass, chlorophyll and carotenoids using the dairy industry by-products cotta as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 11, 207-213, 2017.

RIOS, D. A. S. et al. Rice parboiling wastewater in the maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 39, n. 4, p. 401-410, 2015.

ROSAS, V. T. et al. Comparison of β -carotene and spirulina (*Arthrospira platensis*) in mullet (mugilliza) diets and effects on antioxidant performance and fillet colouration. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2391-2399, 2019.

ROSTAMI, H.; HAMED, H.; YOLMEH, M. Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 684-695, 2016

SAENGE, C. et al. Efficient concomitant production lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 23-33, 2011.

SAMPAIO, J. P. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (eds). The yeasts, a taxonomic study, ed. 5, v. 3, *Elsevier*, Amsterdam, p. 1873–1927, 2011.

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

SIQUEIRA, A.M.O.; MACHADO, E.C.L.; STAMFORD, T.L.M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1693-1700, 2013.

TANG, W. et al. Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 507-517, 2019.

TKÁČOVÁ, J. et al. Screening of carotenoid producing *Rhodotorula* strains isolated from natural sources. **Acta Chimica Slovaca**, v. 8, n. 1, p. 34-38, 2015.

TORRES, F. A. E. et al. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511-2521, 2016.

TOTI, E. et al. Non-Provitamin A and Provitamin A Carotenoids as Immunomodulators: Recommended Dietary Allowance, Therapeutic Index, or Personalized Nutrition? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

ÚBEDA, B., ET AL. Microalgae cultivation in urban wastewater: *Coelastrum* cf. *pseudomicroporum* as a novel carotenoid source and a potential microalgae harvesting tool. **Bioresource Technology**, v. 228, p.210-217, 2017.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. β -Carotene biotransformation to obtain aroma compounds. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 822-827, 2010.

UNGUREANU, C.; FERDES, M.; CHIRVASE, A.A. Torularhodin biosynthesis and extraction by yeast cells of *Rhodotorula Rubra*. **Revista de Chimie**, v. 63, n. 3, 2012.

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

WOODSIDE, J. V. et al. Carotenoids and health in older people. **Maturitas**, v. 80, p. 63–68, 2015.

XIAO, A.; JIANG, X.; NI, H.; YANG, Q.; CAI, H. Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation during *Phaffia rhodozyma* fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 148–153, 2015.

XIAO, H. ZHANG, Y., WANG, M. Discovery and engineering of cytochrome P450s for terpenoid biosynthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 618–631, 2019.

XU, Y.; HARVEY, P. J. Carotenoid Production by *Dunaliella* salina under Red Light. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, p. 1-14, 2019.

YADAV, J.S.S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, p.756-774, 2015.

YEN, H. W.; LIAO, Y. T; LIU, Y. X. Cultivation of oleaginous *Rhodotorula mucilaginosa* in airlift bioreactor by using seawater. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 2, p. 209-212, 2016.

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.

YOO, A.Y.; ALNAEELI, M.; PARK, J.K. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 463–473, 2016.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. L. Carotenoids-Antioxidant Properties. **Antioxidants**, v. 7, n. 28, p. 1-4, 2018.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 149-153, 2014.

Capítulo 1

USO ALTERNATIVO DO SORO DE QUEIJO COALHO PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula glutinis* URM 6692

Sabrina Roberta Santana da Silva, Beatriz de Aquino Marques da Costa, Márcia Nieves Carneiro da Cunha, Vagne de Melo Oliveira, Polyanna Nunes Herculano Ana Lúcia Figueiredo Porto

Artigo a ser submetido à:



Fator de impacto: 2.154

Qualis: B1 (QUADRIÊNIO 2013-2016)

Uso alternativo do soro de queijo coalho para a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* URM 6692

Sabrina Roberta Santana da Silva^a, Beatriz de Aquino Marques da Costa^a, Márcia Nieves Carneiro da Cunha^a, Vagne de Melo Oliveira^a, Polyanna Nunes Herculano^b
Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a*}

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^b Universidade São Miguel, Recife - PE, Brasil.

Autor para correspondência: Ana Lúcia Figueiredo Porto, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil, email: analuporto@yahoo.com.br

Palavras-chave: Soro, queijo, fermentação submersa, *Rhodotorula glutinis*, carotenóides.

Resumo

Foram avaliados parâmetros de produção de pigmentos carotenóides de seis espécies do gênero *Rhodotorula* em fermentação submersa utilizando soro de queijo coalho (SQC). Para a seleção da melhor produtora, as leveduras foram cultivadas em SQC como fonte única de carbono e nitrogênio em shaker orbital a 30°C e 150 rpm durante 120h. Em seguida, a levedura selecionada foi submetida a um cultivo utilizando um planejamento fatorial completo 2³ para determinar o efeito das

variáveis independentes: concentração do SQC (50, 75 e 100%), pH (4.5, 5.0 e 5.5) e agitação (100, 150 e 200 rpm), sob a produção de biomassa, carotenóides totais e o consumo de lactose. A *Rhodotorula glutinis* URM 6692 apresentou produtividade máxima (21,22 mg/g.h⁻¹) em apenas 24 horas de fermentação, sendo selecionada para as próximas etapas. A análise estatística demonstrou que o teor de soro e a agitação foram significativos para a produção de pigmentos, enquanto apenas o soro foi significativo para a produção de biomassa. Assim, 69,32 mg/L de carotenóides totais foram obtidos de 15,50 g/L da biomassa de *R. glutinis* URM 6692 no ensaio composto por 50% (v/v) de soro de queijo coalho, pH 5.5 e 200 rpm, obtendo um rendimento de 2,89 mg/L.h⁻¹ de carotenóides. *R. glutinis* URM 6692 apresentou resultados eficientes para a produção de carotenóides de interesse industrial utilizando o soro de queijo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

1. Introdução

Conhecidos pelo numeroso rol de benefícios conferidos ao organismo, os carotenóides são um dos grupos de substâncias naturais que contribuem fortemente com a expansão do mercado global de pigmentos. Avaliado em cerca de US\$1,22 bilhões em 2016, o mercado global de carotenóides poderá atingir cerca de US\$1,68 bilhões em 2018 com uma expectativa de crescimento anual de 3,6% (BCC Research 2018). Esta tendência de mercado tem se fortalecido mediante a crescente demanda mundial requerida por diversos ramos da indústria,

especialmente, alimentos, bebidas e cosméticos, por exemplo (Mata-Gómez et al. 2014).

Amarelo, laranja e vermelho são as cores características dos carotenóides, pigmentos amplamente encontrados em vegetais, animais e microrganismos. (Mezzomo e Ferreira 2016; Cheng and Yang 2016). Além do seu forte poder colorante, os carotenóides desempenham atividades biológicas importantes, atuando em diversas frentes no organismo, como: agentes pró-vitamina A, proporcionando a redução da carência de vitamina A em populações de países em desenvolvimento através de uma dieta rica em carotenóides, sobretudo, em betacaroteno (Eggersdorfer and Wyss 2018; Palmer et al. 2012); poderosos agentes antioxidantes reduzindo o estresse oxidativo provocado por aumento no nível de espécies reativas de oxigênio (Fiedor and Burda 2014); eficazes antimicrobianos contra várias espécies de bactérias patogênicas gram-positivas e gram negativas (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, por exemplo) (Yolmeh and Khomeiri 2017); importantes agentes antiinflamatórios, ao regular a secreção das citocinas do tecido adiposo branco (WAT), auxiliando na redução da gordura corporal e na modulação dos níveis sanguíneos de glicose e insulina que provocam a inflamação, um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares (Gammone, Riccione and D'Orazio 2015); agentes fotoprotetores, agindo moderadamente contra eritemas induzidos por raios ultravioleta (UV), entre outros. Assim, a ampla funcionalidade dos carotenóides no organismo humano estimulada pela busca de uma melhor qualidade de vida e condição de saúde geral, fortalece o crescimento da demanda mundial por esses compostos, sobretudo, pela atividade das indústrias farmacêutica e de alimentos (Mata-Gómez et al. 2014). Além disso, aumenta a possibilidade de atuar estimulando a produção industrial, o desenvolvimento de processos que possam

contribuir com as necessidades do mercado e, ainda apoiar a expansão das negociações financeiras no mercado global de carotenóides.

O desenvolvimento de estratégias para baratear os custos da produção de carotenóides e de outros bioativos é uma realidade que tem sido fortalecida cada dia a mais com este cenário. Assim, vários estudos têm avaliado o uso de fontes de nutrientes alternativas para a produção microbiana desses compostos. Resíduos da agroindústria como bagaço de cana-de-açúcar, melaço de cana-de-açúcar, águas residuais urbanas, águas residuais da produção de batatas, soro de queijo, glicerol derivado da produção de biodiesel, resíduo de ketchup são alguns exemplos (Cheng and Yang 2016; Kot et al. 2017; Úbeda et al. 2017, Murari et al. 2019).

Também conhecido como soro de leite ou lactossoro, o soro de queijo é um resíduo característico da atividade industrial dos laticínios que, em virtude de sua rica composição nutricional (lactose, proteínas do soro, vitaminas e sais minerais além de cerca da metade dos sólidos do leite), apresenta um importante potencial de degradação do meio ambiente provocada pela alta demanda química de oxigênio (DQO = 50-80 g/L) (Barbosa et al. 2010; Baldasso et al. 2011; FAO 2013; Carvalho et al. 2013). Com a produção de leite e derivados, cresce também a disponibilidade de soro, fato que preocupa, mas que ao mesmo tempo estimula o desenvolvimento de alternativas inovadoras que permitam baratear os custos para o seu tratamento, assim como o seu reaproveitamento (Barbosa et al. 2010; Yadav et al. 2015). Deste modo, a possibilidade de gerar dano ao meio ambiente poderá se tornar um acontecimento cada vez mais distante da realidade.

O uso do soro de queijo em processos biotecnológicos pode ser a chave para a obtenção de produtos bioativos de alto valor agregado por microrganismos como as leveduras do gênero *Rhodotorula*, cuja capacidade de transformar

polissacarídeos de resíduos agroindustriais em lipídeos, carotenóides e outras substâncias já vem sendo amplamente estudada (Mezzomo and Ferreira 2016). Nesta perspectiva, considerando as características nutricionais do soro, a disponibilidade de soro de queijo coalho e o potencial associado ao gênero *Rhodotorula*, este estudo objetivou avaliar os parâmetros de produção de pigmentos carotenóides por espécies de leveduras desse gênero.

2. Materiais e métodos

2.1 Soro de queijo Coalho

Coleta e manutenção

O soro do queijo coalho foi gentilmente cedido por uma indústria de laticínios localizada no município de Garanhuns – PE. O soro do queijo foi transportado sob refrigeração, uma alíquota de 300 mL do volume obtido foi separada para determinação de suas características físico-químicas, e o restante foi armazenado em freezer a -20°C até o momento de sua utilização. Para cultivo dos microrganismos o soro foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seguida, em ambiente asséptico, o resíduo foi resfriado a temperatura ambiente, filtrado e transferido para Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizados para produção dos carotenóides.

Caracterização físico-química

A concentração de glicídios redutores em lactose foi determinada através de Método de Lane-Eynon (Brasil 2006), conforme preconizado pelo Instituto Adolf Lutz (IAL 2008). O método consiste na titulação de uma solução preparada com 10 mL da amostra que promove uma mudança na coloração da solução com os reativos de

Fehling (cor azul) durante a ebulição. A titulação foi realizada até o momento que a coloração da mistura se tornou incolor e formou um precipitado com cor de tijolo no fundo do balão. Com o valor do volume gasto, foi realizada a quantificação da solução com a amostra, sendo utilizada a equação 1.

$$LAC (\%) = \frac{V \times 0,068 \times 100}{L \times v} \quad (1)$$

Onde V é igual ao volume (mL) da diluição da amostra (100 mL), 0,068 corresponde a massa (g de lactose) correspondente a 10 mL da solução de Fehling, L é igual ao volume (mL) da amostra e o v é o volume (mL) da solução da amostra gasto na titulação.

A determinação de lipídios totais foi determinada de acordo com o método do butirômetro de Gerber para leite fluido (Brasil 2006), conforme preconizado pelo Instituto Adolf Lutz (IAL) (2008), que consiste na reação entre ácido sulfúrico, álcool isoamílico e a amostra do soro. Os reagentes e a amostra são colocados em um lactobutirômetro com uma escala de 0 – 1,0% e em seguida é misturada vagarosamente permitindo o maior contato da amostra com os reagentes no meio reacional. Posteriormente, o lactobutirômetro com a mistura é centrifugado e em seguida, é levado ao banho-maria a $63 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 a 3 minutos. O valor obtido na escala corresponde ao percentual de gordura.

Para determinação do conteúdo mineral total presente na amostra foi utilizada o método MET POA (2001) adotado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Este método utiliza o procedimento da digestão via seca, que consiste na carbonização da amostra em chama direta seguida da

calcinação em mufla a 550°C. A quantificação do resíduo mineral fixo foi realizada de acordo com a equação 2.

$$RMF (\%) = \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{m_n} \quad (2)$$

Onde RMF (%), é o percentual de resíduo mineral fixo; m_2 é a massa em gramas do cadinho com amostra pós-incineração; m_1 é a massa em gramas do cadinho vazio e, m_0 é a massa inicial em grama da amostra.

2.2. Microorganismo e manutenção

Seis culturas de *Rhodotorula* isoladas a partir de frutos da Caatinga foram adquiridas da Coleção de Cultura URM (University Recife Mycology), do Departamento de Micologia, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CB/UFPE). As linhagens utilizadas foram: *R. aurantiaca* URM 6687, *R. glutinis* (URM 6683, URM 6691, URM 6692 e URM 6695) e *R. minuta* URM 6693. Os micro-organismos foram crescidos em tubos inclinados com meio ASD (Ágar Sabouraud Dextrose) adicionado de 20% de glicerol, e incubados a 30°C por um período de 3 a 5 dias. Em seguida foram estocadas em refrigerador a 4°C, sendo repicadas mensalmente.

2.3 Inóculo

Para o preparo do inóculo as leveduras foram crescidas aerobiamente em Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de CSD (Caldo Sabouraud Dextrose) sob 150 rpm e 30°C por um período de 24 horas, a concentração celular foi padronizada

para o nível 0,5 da escala de MacFarland correspondendo a uma concentração de 10^8 cél/mL.

*2.4 Seleção de *Rhodotorula* para produção de carotenóides*

Para seleção da espécie de *Rhodotorula* para a produção de carotenóides, foram transferidos 10 mL do inóculo para Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do soro do queijo coalho para uma concentração final de 90% (v/v). Os ensaios foram mantidos a 30°C, sob agitação orbital de 150 rpm durante 120 horas, em ausência total de luminosidade. A cada 24 horas 1 frasco foi retirado, o volume foi centrifugado a 4500 rpm por 10 min, o material sedimentado foi utilizado para a determinação da produção de biomassa, carotenóides totais, e o sobrenadante utilizado para determinar o consumo de lactose e concentração de proteínas. A levedura que produziu maior quantidade de carotenóides totais em menor tempo foi selecionada para a próxima etapa.

2.5 Determinação da melhor condição de cultivo para produção de carotenóides utilizando Planejamento Fatorial 2³

A determinação da melhor condição de cultivo para produção de carotenóides foi realizada de acordo com um Planejamento Fatorial completo 2³ (Box, Hunter & Hunter), composto por 8 ensaios adicionados de 3 repetições do ponto central para estimativa do erro puro. O efeito das variáveis independentes: (1) concentração do soro, (2) agitação e (3) pH foi avaliado para as respostas: taxas de produção de biomassa seca (X), produção de carotenóides totais (PT) e consumo de lactose (S).

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo diferentes concentrações de soro de queijo coalho em diferentes valores de pH (de acordo com a Tabela 1) foram

adicionados de 10 mL do inóculo. Os ensaios foram mantidos a 30°C por 24 horas, sob abrigo da luz, após esse período o líquido fermentado obtido foi centrifugado, o sobrenadante e o material decantado foram utilizados para determinações analíticas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 8.0. (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

2.6 Determinação da concentração celular, consumo de lactose e proteínas totais

A concentração celular foi obtida por leitura espectrofotométrica por densidade óptica sob a absorbância $\lambda = 595$ nm, e a biomassa seca foi monitorada por gravimetria em tubos Falcon previamente pesados para peso de amostra constante (Moliné et al. 2012). O Consumo de lactose foi determinado pela diferença entre o teor de lactose inicial (presente no soro do queijo) e final (após a fermentação) determinado conforme descrito no item 2.1.2. As amostras do sobrenadante foram utilizadas em ambos os ensaios. A concentração de proteínas foi realizada utilizando kit de BCA (ácido bicinconínico), conforme descrita por Smith et al. (1985).

2.7 Extração e quantificação dos carotenóides

Após centrifugação (item 2.4 e 2.5) a biomassa úmida precipitada foi submetida ao processo de extração conforme reportado por Moliné et al. (2012). Após a extração, as amostras de pigmento obtidas foram analisadas em espectrofotômetro a 448nm. Determinadas as absorbâncias de cada amostra, os valores foram calculados com base na equação 3.

$$CT = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1\%}^{1\text{cm}} \times 100 \times m_a} \quad (3)$$

Onde CT é a concentração total de carotenóides ($\mu\text{g/g}$), A é a absorbância, V é o volume (mL), m_a é a massa seca da amostra (g) e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ é a absorvitividade específica (a absorvitividade específica de β -caroteno, principal produto carotenóide, em éter de petróleo é 2592), de acordo com Davies et al. (1976).

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização do substrato

Com o intuito de conhecer a composição centesimal de macronutrientes e micronutrientes (representado pelo resíduo mineral fixo) foi realizada a caracterização do soro de queijo de coalho utilizado neste experimento, cujos resultados se encontram na tabela 2. Por se tratar de um produto que ainda não foi regulamentado, existe certa dificuldade para determinar os seus padrões de qualidade, em virtude disso, considerando o pH, o soro apresenta um perfil típico do soro de leite ácido. Já o teor de lactose é correspondente a aqueles encontrados no soro obtidos a partir da produção de queijo mozzarella e queijo-minas padrão, que foi 4,42g e 4,12g a cada 100 g de soro, respectivamente (Teixeira e Fonseca 2008). Assim, o soro forneceu aos micro-organismos uma rica fonte de carbono e nitrogênio. É importante considerar que a acidez apresentada pelo soro é um dos fatores que garantem aos micro-organismos um ambiente hostil o suficiente para promover o estresse necessário para acionar os mecanismos fisiológicos adequados para produção de metabólitos secundários, como os carotenóides.

3.2 Seleção de *Rhodotorula* para produção de carotenóides

A espécie de *Rhodotorula* foi selecionada de acordo com a capacidade de produzir carotenóides. Ao analisar a Figura 1 é possível perceber que a melhor

produção de carotenóides foi realizada por *R. glutinis* URM 6692, demonstrando habilidade para a carotenogênese na condição avaliada, com uma produção máxima específica de carotenóides totais de 509,26 mg/g ocorrendo ainda nas primeiras 24 horas de produção, onde exibiu uma produtividade de 21,22 mg/g.h⁻¹.

O melhor perfil de consumo de lactose também foi observado na fermentação de *R. glutinis* URM 6692 após 24 h de fermentação, mesmo período em que a levedura alcançou a máxima produção de carotenóides. Com um consumo registrado de apenas 0,68 g/L, o que corresponde a um total de 16,66% da lactose disponibilizada no início da fermentação, a levedura se comportou de forma eficiente quando comparada às demais avaliadas neste estudo.

A segunda levedura mais eficiente foi a *R. glutinis* URM 6691 que consumiu 0,89 g/L de lactose (21,88% do total), apresentando o segundo melhor desempenho também na produção de carotenóides que foi de 95,38 mg/g, porém com uma produtividade de apenas 3,97 mg/g.h⁻¹. Este fato indica que um melhor ajuste é necessário para que a levedura possa demonstrar todo o seu potencial de produção de pigmentos.

O crescimento celular das leveduras no soro de queijo coalho foi avaliado, e já nas primeiras 24 h, foram obtidos valores que variaram entre 4,2 e 7,1 g/L de biomassa seca, exceto *R. glutinis* URM 6691 (0,9 g/L) e *R. glutinis* URM 6692 (0,4 g/L). Dentre as estirpes analisadas, *R. glutinis* URM 6692 foi a que apresentou maior crescimento celular no meio de cultivo, produzindo 16 g/L de biomassa seca após 120 h de cultivo, com uma produtividade de 0,13 g/L.h⁻¹. Ao realizar experimentos para determinar o efeito da relação carbono/nitrogênio sobre a produção de biomassa por *R. glutinis*, Braunwald et al. (2013) obtiveram resultados aproximados, verificando que o meio de cultivo C/N 20n (57 g/L de glicose e 4,885 g/L de sulfato

de amônio), levou a uma produção de 11,4 g/L de biomassa após 216 h de fermentação, exibindo uma produtividade de 0,05g/L·h⁻¹. Assim, de acordo com os autores, a utilização do soro de queijo de coalho como meio de cultivo favoreceu o crescimento celular, reforçando que o soro pode atuar como um substituto adequado para ser utilizado em detrimento aos substratos comerciais para produção de biomassa pela levedura *R. glutinis*, corroborando com os dados do nosso trabalho e sinalizando o potencial desta levedura.

Aqui, *R. glutinis* URM 6692 foi considerada a mais adequada para prosseguir para a próxima etapa, tendo em vista a sua habilidade para produzir carotenóides em menor tempo, podendo contribuir para um melhor desempenho em ambientes que exigem taxas de produtividade dinâmicas atendendo a exigências das indústrias farmacêutica e de biotecnologia.

3.3 Determinação da melhor condição para produção de carotenóides por Rhodotorula glutinis URM 6692 utilizando planejamento fatorial

Os resultados da produção de biomassa, do consumo de lactose, da produção de carotenóides, do rendimento de carotenóides para cada g de lactose consumida e a produtividade dessa produção por hora obtidos após 24h de cultivo de *R. glutinis* URM 6692 estão apresentados na tabela 3. A maior concentração de carotenóides foi de 69,32 mg/L obtido no ensaio 7 composto por 50% de concentração de soro do queijo coalho, pH 5,5, e utilizando 200 rpm de agitação, neste ensaio para cada g de lactose consumida pela levedura foi possível extrair 8,497 mg/g de carotenóides, com uma produtividade de 2,89 mg/L.h⁻¹. Os resultados obtidos neste estudo para concentração do pigmento foram superiores quando comparados aos encontrados por Leyton et al. (2018), que avaliaram a produção de

carotenóides por *R. mucilaginosa* utilizando meio de cultivo a base de extrato de algas marinhas a pH 7, sob 150 rpm de agitação, e obtiveram uma produção de 1,84 mg/L de carotenóides totais.

Valores de produção de carotenóides totais obtidos por diferentes espécies de leveduras do gênero *Rhodotorula* utilizando fermentação submersa em meios de cultura comerciais e alternativos estão descritos na tabela 4. A quantidade de biomassa produzida neste trabalho não exerceu influência na acumulação de pigmentos pela levedura, de modo que na melhor condição para obtenção deste metabólito foram produzidos apenas 15,5 g/L de biomassa pelo micro-organismo. Este resultado foi importante para esclarecer que a produção dos carotenóides independe da produção de biomassa. Corroborando com o descrito por Aksu; Eren (2005), que produziram uma concentração total máxima de carotenóides e produtividade de 56,8 mg/L e 35,5 mg/g·h⁻¹, respectivamente, após 240 h de fermentação utilizando *R. glutinis*, indicando a relação tempo × produção total máxima de carotenóides.

A análise estatística dos resultados indicou que dentre as variáveis estudadas a concentração de soro de queijo coalho (C_{SQC}, g/L) e a agitação (rpm) influenciaram positivamente na formação da biomassa (X, g/L), (dados apresentados na Tabela 4) visto que, nos ensaios 6 e 8 compostos pela maior concentração do substrato (100%) onde utilizou-se maior agitação houve uma maior produção de biomassa pelo micro-organismo, 37,5 g/L e 41,5 g/L, respectivamente. Para essa variável resposta nenhuma interação entre as variáveis independentes foi estatisticamente significativa.

Machado et al. (2019) reportaram a relação consumo rápido de substrato e a elevação do crescimento celular, reforçando a hipótese até então de que a maior

concentração volumétrica de carotenóides está relacionada com um maior tempo. Todavia, como descrito na tabela 4, a nossa produção máxima de carotenóides foi realizada em 24h, otimizando tempo e biomassa, características desejáveis do ponto de vista industrial.

Já para variável resposta consumo de lactose (S) apresentado por *R. glutinis* URM 6692 após 24 horas de fermentação, apenas a variável independente concentração de soro de queijo coalho apresentou influência significativa sobre essa variável. Indicando que uma maior concentração do soro de queijo estimulou o consumo desse substrato pelo microrganismo. A interação entre as variáveis (1) concentração de soro de queijo (C_{SQC}) e o (2) pH influenciou negativamente para a assimilação desse açúcar. Observando a figura 2 que apresenta os efeitos estatísticos estimados para essa interação (1x2) é possível inferir que o efeito das duas variáveis foi antagônico indicando que a maior concentração do soro de queijo coalho (100 %) e o menor valor de pH 4,5 favoreceu o consumo da lactose.

Segundo Mata-Gómez et al (2014) no estudo das variáveis que influenciam a produção de carotenóides por leveduras, a fonte de carbono é o parâmetro mais estudado por apresentar forte influência sobre a carotenogênese. O metabolismo das leveduras atua dependendo do tipo de fonte de carbono do meio. O efeito da concentração do soro do queijo coalho sob a concentração de carotenóides foi negativo, visto que, maiores concentrações do pigmento foram obtidas nos ensaios compostos com apenas 50% deste substrato. Em contrapartida, o desempenho da levedura foi estimulado pela agitação, visto que esta variável influenciou positivamente na resposta desta estirpe à produção de carotenóides totais, como apresentado na tabela 5. A agitação é um importante parâmetro a ser considerado em estudos utilizando fracos agitados, visto que, uma taxa de agitação adequada

favorece a oxigenação e a disponibilidade dos nutrientes presentes no meio, entretanto, em agitações elevadas pode ocorrer ruptura celular e consequentemente menor produtividade.

4. Conclusão

O uso de soro de queijo de coalho em processos fermentativos submersos demonstrou que este co-produto é um excelente substrato para a produção de pigmentos carotenóides por *Rhodotorula* em um curto período, sendo um material barato e de matéria-prima disponível. A partir de cada grama de lactose presente no soro, *R. glutinis* URM 6692 foi capaz de produzir 2,89 mg/L de carotenóides, demonstrando sua capacidade de converter o co-produto em composto natural de alto valor agregado. Também, foi possível perceber que a produção de carotenóides pela levedura não apresenta relação direta com a produção de biomassa. O design fatorial ajudou a avaliar as melhores condições de produção de carotenóides, aumentando consideravelmente a obtenção de pigmentos pela levedura, evidenciando que o ajuste das condições de cultivo é necessário quando se pretende atingir rendimentos superiores tanto na produção de carotenóides, como na de biomassa da levedura, atendendo as demandas industriais.

Referências

Aksu Z, Eren AT (2005) Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem* 40:2985–2991. doi: 10.1016/j.procbio.2005.01.011

- Abreu AP, Fernandes B, Vicente, AA et al (2012) Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour Technol* 118:61–66. doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.055
- Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC (2011) Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278: 381-386. doi: 10.1016/j.desal.2011.05.055
- Barbosa AS, Florentino ER, Florêncio IM (2010) Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. *Revista Verde* 5:7-25.
- Besarab NV, Gerasimovich KM, Kanterova AV et al (2019) Biosynthetic production of carotenoids using yeast strains of genus *Rhodotorula* on the cheap beer wort substrate. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 7:383-386. doi: 10.15414/jmbfs.2018.7.383-386
- Brasil (2006) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.
- Braundwald T, Schwemmlin L, Graeff-Hönninger S et al (2013) Effect of different C/N-ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6581-6588. doi: 10.1007/s00253-013-5005-8
- Carvalho F, Prazeres AR., Rivas J (2012) Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci Total Environ* 445-446:385-396. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.12.038
- Chan LG et al (2018) Bioconversion of cheese whey permeate into fungal oil by *Mucor circinelloides*. *J Biol Eng* 12: 1-14. doi: 10.1186/s13036-018-0116-5

- Cheng YT, Yang CF (2016) Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. J Taiwan Inst Chem Eng 61:270-275. doi: 10.1016/j.jtice.2015.12.027
- Da Silva SRS, Stamford TCM., Albuquerque WWC et al (2020). Reutilization of residual glycerin for the produce β -carotene by *Rhodotorula minuta*. Biotechnol Lett 42:437-443. doi: 10.1007/s10529-020-02790-8
- Davies BH (1976) Carotenoids. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 2nd ed. Goodwin, T.W. (ed.). London-New York-San Francisco: Academic Press 2:38–165.
- Eggersdorfer M, Wyss A (2018) Carotenoids in human nutrition and health. Arch Biochem 652:18-26. doi: 10.1016/j.abb.2018.06.001
- Elefky N., Elmahmoudy M, Bao, Y. (2020). Manipulation of Culture Conditions: Tool for Correlating/Improving Lipid and Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis*. Processes 8:140. doi: 10.3390/pr8020140
- Elsanhoty RM, Abd El-Razink MM, Al-Turki AI (2017) Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. J Food Agric Environ 15:21-26.
- Fiedor J, Burda K (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. Nutrients 6:466-488. doi: 10.3390/nu6020466
- FAO. 2019. Dairy Market Review, March, 2019. Rome.
- Gammone MA, Riccione G, D'Orazio N (2015) Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? Food Nutr Res 59:1-11. doi: 10.3402/fnr.v59.26762
- Gans J, Wolinsky M, Dunbar J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science 309:1387–1390. doi: 10.1126/science.1112665

- Giovanardi M, Baldisserotto, C, Dagli M et al (2016) Morpho-physiological aspects of *Scenedesmus acutus* PVUW12 cultivated with a dairy industry waste and after starvation. Plant Biosyst 150:767–775. doi: 10.1080/11263504.2014.991361
- Huang S, Cauty C, Dolivet A et al (2016) Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. J. Funct Foods 23:453–463. doi: 10.1016/j.jff.2016.02.050
- Instituto Adolfo Lutz (2008) Métodos físico-químicos para análise de alimentos, ed. 4, São Paulo. 1020.
- Kareb O, Champagne CP, Jean J et al (2018) Effect of electro-activated sweet whey on growth of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus* strains under model growth conditions. Food Res Int 103:316–325. doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.060
- Kot A M, Blazejak S, Kieliszek M et al (2020). Production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula gracilis* ATCC 10788 yeast in a bioreactor using low-cost wastes. Biocatal Agric Biotechnol 26:101634. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101634
- Latha BV, Jeevaratnam K, Murali HS et al (2005) Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. Indian J Biotechnol 4:353-357.
- Leyton A, Flores L, Mäki-Arvela P et al (2019) *Macrocystis pyrifera* source of nutrients for the production of carotenoids by a marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. J. Appl. Microbiol 127:1069-1079. doi: 10.1111/jam.14362

- Lopes FC, Tichota DM, Sauter IP et al (2013) Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* ifl1 growing on agro-industrial residues. *Ann Microbiol* 63:771–778. doi: 10.1007/s13213-012-0532-6
- Machado WRM, Silva LG, Vanzela ESL. et al (2019) Production of carotenoids by *Rhodotorula toruloides* isolated from Brazilian tropical savannah. *Int Food Res J* 26:1259-1267.
- Maldonado IR, Rodriguez-Amaya DB, Scamparini ARP (2008) Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chem* 3:159-164. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.075
- Mezzomo N, Ferreira SRS (2016) Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *J. Chem.*, 16 p. doi: 10.1155/2016/3164312
- Moliné M, Libkind D, Van Broock M (2012) Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. *Methods Mol Biol* 898:275–283. doi: 10.1007/978-1-61779-918-1_19. 2012.
- Murari CS, Machado WRC, Schiuna GL et al (2019) Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatal Agric Biotechnol* 20:101182. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101182
- Palmer AC, West KP, Dalmiya N et al (2012) The use and interpretation of serum retinol distributions in evaluating the public health impact of vitamin A programmes. *Public Health Nutr* 15:1201-1215. doi: 10.1017/S1368980012000560
- Revin V, Liyaskina E, Nazarkina M et al (2018) Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Braz J Microbiol* 49:151–159. doi: 10.1016/j.bjm.2017.12.012
- Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT et al (2011) Efficient concomitant production lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and

application of lipids for biodiesel production. *Biotechnol Bioproc E* 16:23-33. doi: 10.1007/s12257-010-0083-2

Sharma R., Ghosal G. (2020) Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. *Biotechnol Rep* 25:e00407. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00407

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7

Suwal S, Bentahar J, Marciniak A et al (2019) Evidence of the production of galactooligosaccharide from whey permeate by the microalgae *Tetradesmus obliquus*. *Algal Res* 39:101470. doi: 10.1016/j.algal.2019.101470

Teixeira LV, Fonseca LM (2008) Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 60:243-250. doi: 10.1590/S0102-09352008000100033

Varzakakou, M.; Roukas, T.; Papaioannou, E et al (2011) Autolysis of *Blakeslea trispora* during carotene production from cheese whey in an air lift reactor. *Prep Biochem Biotech* 41:7–21. doi: 10.1080/10826068.2010.525436

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

Yolmeh M, Khomeiri M (2017) Effect of mutagenesis treatment on antimicrobial and antioxidant activities of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis*. *Biocatal Agric Biotechnol* 10:285-290. doi: 10.1016/j.bcab.2017.04.007

Zhao Y, Guo L, Xia Y et al (2019). Isolation, identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. From marine environment and optimization for carotenoid production. Mar Drugs 17:161.

TABLE CAPTION

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes analisadas no planejamento experimental fatorial 2^3 (Box, Hunter & Hunter) para produção de carotenóides por *Rhodotorula* sp. em fermentação submersa

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Soro (%)	50	75	90
pH	4,5	5,00	5,5
Agitação (rpm)	100	150	200

Tabela 2. Composição centesimal dos macronutrientes e resíduo mineral fixo presentes no soro de queijo coalho do município de Garanhuns-PE.

Composição nutricional do soro de queijo coalho	
Lactose (%)	4,53
Proteínas (mg/mL)	4,48
pH	4,53
Gordura (%)	0,30
Resíduo Mineral Fixo (%)	0,19

Tabela 3. Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 e resultados obtidos após 24 h de fermentação de *Rhodotorula glutinis* URM 6692 para a produção de biomassa, produção de carotenóides e rendimento específico.

	Variáveis Independentes			Resultados				
Ensaio	C_{SQC}	pH	Agitação (rpm)	X (g/L)	S (g/L)	CT (mg/L)	Y_{P/S} (mg/g)	Produtividade (mg/L.h⁻¹)
1	50	4,5	100	11,00	6,03	20,69	3,432	0,86
2	100	4,5	100	40,00	22,00	12,44	0,565	0,52
3	50	5,5	100	8,50	3,59	33,36	9,297	1,39
4	100	5,5	100	30,50	14,38	9,42	0,655	0,39
5	50	4,5	200	18,50	5,10	38,89	7,625	1,62
6	100	4,5	200	37,50	16,87	17,44	1,033	0,73
7	50	5,5	200	15,50	8,16	69,32	8,497	2,89
8	100	5,5	200	41,50	14,06	13,57	0,966	0,57
9	75	5	150	14,50	3,42	31,53	9,224	1,31
10	75	5	150	16,00	3,97	31,23	7,864	1,30
11	75	5	150	17,50	5,19	38,58	8,875	1,61

C_{SQC}, é a concentração do soro de queijo;

X, é a concentração de biomassa seca;

S, é a concentração de lactose consumida;

CT, é a concentração volumétrica de carotenóides;

Y_{P/S}, é o rendimento de carotenóides em cada g de lactose consumida

Produtividade, é a produção volumétrica de carotenóides por hora de processo

Tabela 4. Valores de produção de carotenóides totais obtidos por diferentes espécies de leveduras do gênero *Rhodotorula* utilizando fermentação submersa em meios de cultura comerciais e alternativos.

Estirpe	MC	BS	CT	TP	Referência
<i>R. minuta</i> URM6693	Glicerina residual da produção de biodiesel	7,39 g.L ⁻¹	17,20 mg.L ⁻¹	48 h	Da Silva et al., 2020
<i>R. mucilaginosa</i> MTCC-1403	Extratos Aquosos Casca de cebola e casca de feijão mungo	7,22 g.L ⁻¹	710,33 µg.g ⁻¹	120 h	Sharma e Ghoshal, 2020
<i>R. toruloides</i> URM 7406	YM	≅12 g.L ⁻¹	1,333.11 µg.L ⁻¹	144 h	Machado et al., 2019
<i>R. sp.</i> RY1801	YPD	5,63 g.L ⁻¹	987 µg.L ⁻¹	72 h	Zhao et al., 2019
<i>R. gracilis</i> ATCC 10788	Água residual de batata suplementado com uma fração de glicerol (biorreator)	21 g.L ⁻¹	6,24 mg.L ⁻¹	96 h	Kot et al., 2020
<i>R. glutinis</i>	Soro de leite	1,6g.L ⁻¹	56,8 mg/L	240h	Aksu and Eren, 2005
<i>R.mucilaginosa</i>	Extrato aquoso de alga marinha <i>Macrocystis pyrifera</i>	4.9 g.L ⁻¹	1,84 mg L ⁻¹	144 h	Leyton et al., 2019
<i>R.mucilaginosa</i>	YM	12.30 g	18.30 mg L ⁻¹	72 h	Elsanhoty, Turki and Abd El-Razik, 2017
<i>R.mucilaginosa</i>	Meio de cultivo de bagaço de mandioca	4.56 g.L ⁻¹	12.50 mg L ⁻¹	96 h	Manimala and Murugesan, 2017
<i>R. glutinis</i> BIM Y-253	Mosto de cerveja	>10 g.L ⁻¹	150,9 µg.g ⁻¹	96 h	Besarab et al., 2018

MC = Meio de Cultivo

BS = Biomassa Seca

CT = Carotenóides totais

TP = Tempo de Produção

Tabela 5. Efeitos estatísticos calculados para as respostas produção de biomassa (X), concentração de lactose consumida (S) e concentração volumétrica de carotenóides (CT) produzido por *Rhodotorula glutinis* URM 6692 utilizando soro de queijo coalho como substrato nas condições determinadas pelo design experimental 2^3

Variáveis Independentes	Variáveis Respostas		
	X (g/L)	S (g/L)	CT (mg/L)
(1) C_{SQC}	22.63*	17.34*	-9.29*
(2) pH	-2.59	-3.83	3.07
(3) Agitação (rpm)	5.42*	-0.71	5.38*
1x2	0.00	-4.31*	-4.25
1x3	-1.41	-3.55	-3.82
2x3	3.06	4.02	1.44
1x2x3	3.29	-0.27	-1.58

*Valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$).

FIGURE CAPTION

LEGENDA DAS FIGURAS:

Figura 1. Cinética de crescimento das leveduras avaliadas: *R. glutinis* URM 6683 em (a), *R. aurantiaca* URM 6687 em (b), *R. glutinis* URM 6691 em (c), *R. glutinis* URM 6692 em (d), *R. minuta* URM 6693 em (e) e *R. glutinis* URM 6695 em (f), sob condições operacionais padrão: 120 h de cultivo - $C_{SQC} = 90\%$, $T_{inicial} = 30^{\circ}C$, Agit. = 150 rpm.

Figura 2. Diagrama de interpretação geométrica da interação entre concentração do soro de queijo coalho (C_{SQC} , %) e pH sob o consumo de lactose (S, g/L) pela levedura *Rhodotorula glutinis* URM 6692 após 24 horas de cultivo.

Figura 1

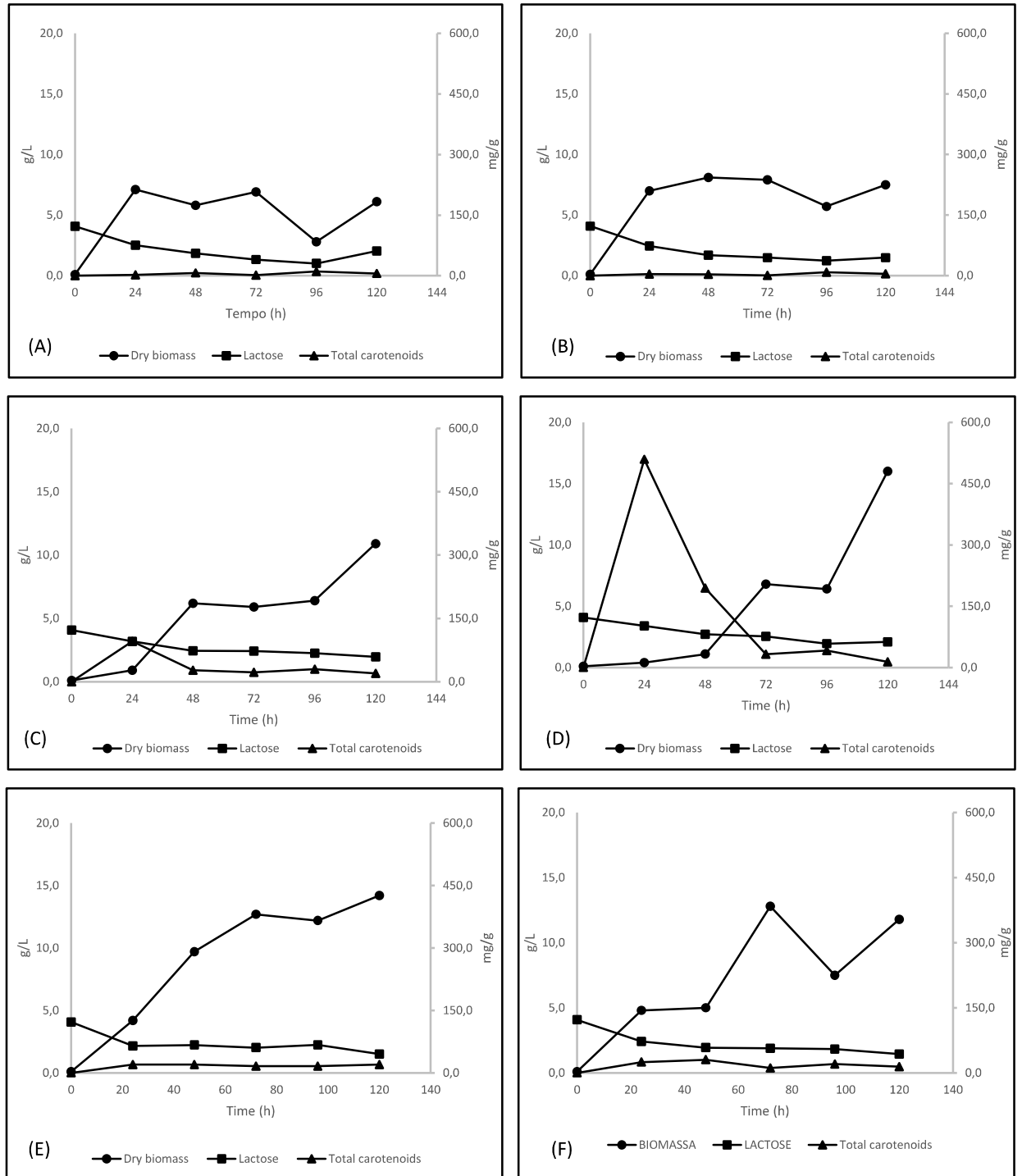
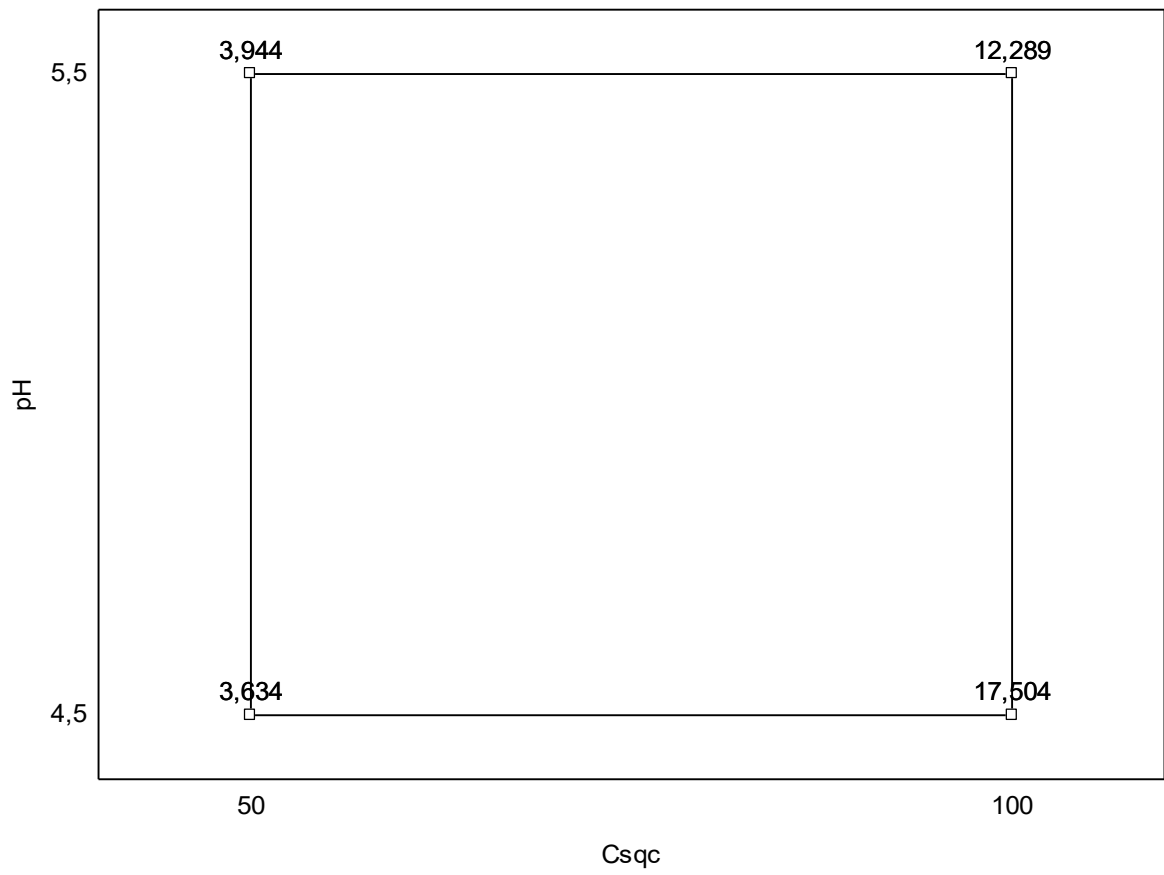


Figura 2

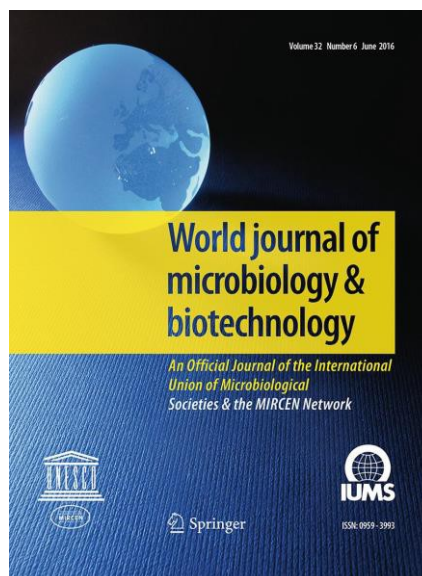


Capítulo 2

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE CAROTENÓIDES PRODUZIDOS POR *Rhodotorula glutinis* URM 6692 PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Sabrina Roberta Santana da Silva, Felype Thomaz de Brito Rocha, Vagne Melo de Oliveira, Juanize Matias da Silva Batista, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
Polyanna Nunes Herculano, Ana Lúcia Figueiredo Porto

Artigo a ser submetido à:



Fator de impacto: 2.652

Qualis: B1 (QUADRIÊNIO 2013-2016)

Avaliação das propriedades antimicrobiana e antioxidante de carotenóides produzidos por *Rhodotorula glutinis* URM 6692 para potencial aplicação em alimentos

Sabrina Roberta Santana da Silva^a, Felype Thomaz de Brito Rocha^a, Vagne Melo de Oliveira^a, Juanize Matias da Silva Batista^a, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa^b, Polyanna Nunes Herculano^c, Ana Lúcia Figueiredo Porto^a

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^c Universidade São Miguel, Recife, Pernambuco, Brasil

Author for correspondence:

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171900, Recife, PE, Brasil, e-mail: analuporto@yahoo.com.br

Resumo

Este trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante dos pigmentos carotenóides produzidos por *Rhodotorula glutinis* cultivada em soro de queijo coalho (SQC) para possível uso como aditivo alimentar. Para obtenção da biomassa, *R. glutinis* URM6692 foi cultivada em SQC, a 30°C, 200 rpm e pH 5.5 durante 24 horas. A partir da biomassa, os pigmentos foram extraídos, concentrados, quantificados e avaliados *in vitro* quanto à eficácia de suas

propriedades antimicrobiana e antioxidante, sendo avaliados nas concentrações de 1,25 a 50 µg/mL. No ensaio antimicrobiano, todas as bactérias patogênicas avaliadas (gram-positivas e gram-negativas) foram inibidas pelo extrato de pigmentos nas duas maiores concentrações avaliadas (2,5 e 5,0 µg/mL). A concentração inibitória mínima necessária para reduzir o crescimento das bactérias foi 2,5 µg/mL, de modo que *E. coli* e *S. aureus* foram as bactérias mais afetadas apresentando cerca de 59,8% e 54,5% de inibição, seguidas de *K. pneumoniae* e *B. subtilis* com 53,9% e 51,3%, respectivamente. O extrato de carotenóides concentrado (12,5 µg/µL) foi eficiente para reduzir aproximadamente 62,5% do potencial oxidante apresentado pelo radical DPPH. Os resultados obtidos sugerem que os pigmentos carotenóides extraídos de *R. glutinis* URM6692 podem, possivelmente, ser empregados em alimentos, cosméticos e fármacos como uma alternativa natural aos corantes e conservantes quimicamente sintetizados.

Palavras-chave: Aditivo natural · Atividades biológicas · Leveduras vermelhas oleaginosas · Pigmentos naturais.

Introdução

A preocupação com o meio ambiente aliada a busca por uma melhor qualidade de vida tem sido temas importantes e amplamente considerados na produção de alimentos saudáveis, com propriedades nutricionais e bioativas em larga escala. Recentemente, as tendências de consumo consciente, ético e sustentável têm sido cada vez mais valorizadas e consideradas pela indústria na elaboração de seus produtos (ANGUS; WESTBROCK, 2019).

O comportamento derivado dessas tendências afeta diretamente na escolha dos alimentos a serem consumidos, considerando sobretudo os benefícios proporcionados ao organismo. Substâncias intencionalmente adicionadas aos alimentos, com ou sem valor nutricional, que não atuam de forma isolada como um nutriente ou um alimento propriamente dito, são consideradas aditivos alimentares. Sob esta perspectiva, o uso de substâncias naturais capazes de agregar propriedades biológicas aos alimentos com a intenção de melhorar, ressaltar e/ou preservar suas propriedades organolépticas, em detrimento daquelas quimicamente sintetizadas, tem sido fortemente encorajado (FDA/WHO, 2018).

De fontes vegetais, animais ou microbianas, os aditivos alimentares podem contribuir para a melhoria dos aspectos tecnológicos dos alimentos, especialmente quando adicionados em quantidades adequadas respeitando as doses diárias recomendadas (ADIs). Por exemplo, os carotenóides que além de colorir os alimentos, podem apresentar propriedades nutricionais e farmacológicas, como as atividades pró-vitamina A, antioxidante, antimicrobiana, antiproliferativa, antitumoral, antihemolítico, entre outras (HOU & CUI, 2018; INETIANBOR et al., 2015; RADDADI et al., 2015; MATA-GOMÉZ et al., 2014). Influenciado pelas pesquisas relacionadas com a otimização da produção de carotenóides assim como às frequentes descobertas dos benefícios inerentes a eles, em 2017 o mercado global de pigmentos movimentou US\$ 1,5 bilhão. E a tendência é que este volume de recursos cresça anualmente, de modo que, em 2022 espera-se que este mercado chegue a US\$ 2,0 bilhões (BCC RESEARCH, 2018).

Dentre as fontes microbianas mais estudadas para a obtenção desses pigmentos, estão as leveduras do gênero *Rhodotorula* que são capazes de converter nutrientes de resíduos agroindustriais, como o soro de queijo, em carotenóides. A

natureza líquida, rico teor nutricional e a grande disponibilidade deste co-produto da indústria de laticínios torna-o um meio plenamente adequado ao cultivo de micro-organismos, permitindo que rendimentos consideráveis de carotenóides sejam obtidos ao ser empregado em cultivos submersos (CHENG & YANG, 2016; KOT *et al.*, 2016). A biomassa da levedura rica em carotenóides é então submetida a processos físico-químicos para a extração dos pigmentos, que posteriormente são purificados e veiculados para as indústrias alimentícia, farmacêutica, de beleza e de cuidados com a saúde.

Neste contexto, ao reconsiderar os hábitos de consumo de forma holística, é possível conhecer e explorar os benefícios vinculados aos aditivos naturais empregados em produtos alimentícios direcionados ao público final. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades antimicrobiana e antioxidante apresentadas pelo extrato de pigmentos carotenóides produzidos por *R. glutinis* URM 6692 cultivado em soro de queijo coalho.

Material e métodos

Obtenção do soro de queijo

Para a realização do estudo foi utilizado soro de queijo coalho (SQC), um conhecido resíduo agroindustrial obtido a partir de uma indústria de laticínios localizada no município de Garanhuns – PE. O resíduo foi mantido em freezer sob uma temperatura de -20°C até o momento do uso, quando foi descongelado e autoclavado a 121°C sob pressão contínua de 1 atm durante 15 minutos. Em seguida, foi filtrado e transferido para um novo recipiente previamente esterilizado e então armazenado até o início da fermentação.

Micro-organismos

A levedura utilizada neste estudo, *Rhodotorula glutinis* URM 6692 foi obtida da Micoteca URM, do Departamento de Micologia, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco (CB/UFPE). Em seguida, a cultura foi mantida em meio ASD (Ágar Sabouraud Dextrose) adicionado de 20% de glicerol, e incubada a 30°C ao longo de 3 a 5 dias, sendo estocada a 4°C e repicada mensalmente.

As estirpes bacterianas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e isolados clínicos de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665) foram cultivadas em 10mL de caldo Mueller-Hinton (MH) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas ou até que a turbidez fosse correspondente 0,5 da escala de MacFarland, sendo então, utilizadas no ensaio antimicrobiano.

Obtenção de biomassa rica em pigmentos

A produção de biomassa da levedura foi realizada em frascos agitados a 30°C, 200 rpm e pH 5.5 por 24 horas. Amostras de 10 mL do caldo fermentado foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e o pellet foi levado para a extração de carotenóides. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e sob o abrigo da luz.

Extração e quantificação dos carotenóides

A biomassa rica em carotenóides foi obtida a partir de amostras de 10 mL do caldo fermentado, lavada com água destilada em vórtex por 1 minuto e novamente centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos, a fim de remover quaisquer resíduos do meio de cultivo. Após isso, o sobrenadante foi descartado e a biomassa úmida precipitada foi submetida ao processo de extração com solventes (Dimetilsulfóxido, acetona e éter de petróleo) conforme Moliné et al. (2012). Após a extração, cada amostra de pigmento foi analisada em espectrofotômetro a 448nm. Determinadas as absorbâncias das amostras, os valores foram calculados a partir da equação 1, onde CT é a concentração total de carotenóides (µg/g), A é a absorbância, V é o volume (mL), $m_{amostra}$ é a massa seca (g) e $A_{1cm}^{1\%}$ é a absorvitividade específica (a absorvitividade específica de β-caroteno em éter de petróleo é 2592), conforme Davies et al. (1976).

$$\text{Equação 1.:} \quad CT = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times 100 \times m_{amostra}}$$

Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada através do método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) apresentada pelo extrato de pigmentos carotenóides obtidos da biomassa de *R. glutinis* URM 6692, conforme a Norma M7-A6 do NCCLS/CLSI (ANVISA, 2005). O controle negativo foi caracterizado pela mistura entre meio de cultura, extrato e água. Enquanto o controle positivo, com exceção dos demais componentes, não constava o extrato. Para a realização desta atividade, quatro estirpes microbianas foram utilizadas (duas gram-positivas e duas gram-negativas). Todo o experimento foi realizado em duplicata.

Determinação da atividade antioxidante

O extrato dos pigmentos carotenóides obtidos da biomassa de *R. glutinis* URM6692 foi concentrado em atmosfera de nitrogênio, protegido da luz e ressuspenso em Dimetil Sulfóxido (DMSO), para determinar a cinética de consumo do DPPH (150 μ mol/L), bem como, a capacidade de sequestro do radical apresentada pelos pigmentos por minuto ao longo de 10 minutos. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, com leitura realizada a 562nm, de modo que a mistura reagente foi formada por 180 μ L de solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e 20 μ L do extrato concentrado (12,5 mg de carotenóides/mL). Uma mistura de 20 μ L de DMSO e 180 μ L da solução de DDPH foi utilizada como controle negativo (branco). A capacidade de sequestro do radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a equação 2. O experimento foi realizado em duplicata.

Equação 2.

$$\% \text{ AA} = \frac{\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}}$$

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão em ambos os ensaios (antimicrobiano e antioxidante). Em seguida, foram submetidos a análise de variância de um fator – ANOVA one-way ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada no software STATISTICA 10.0.

Resultados

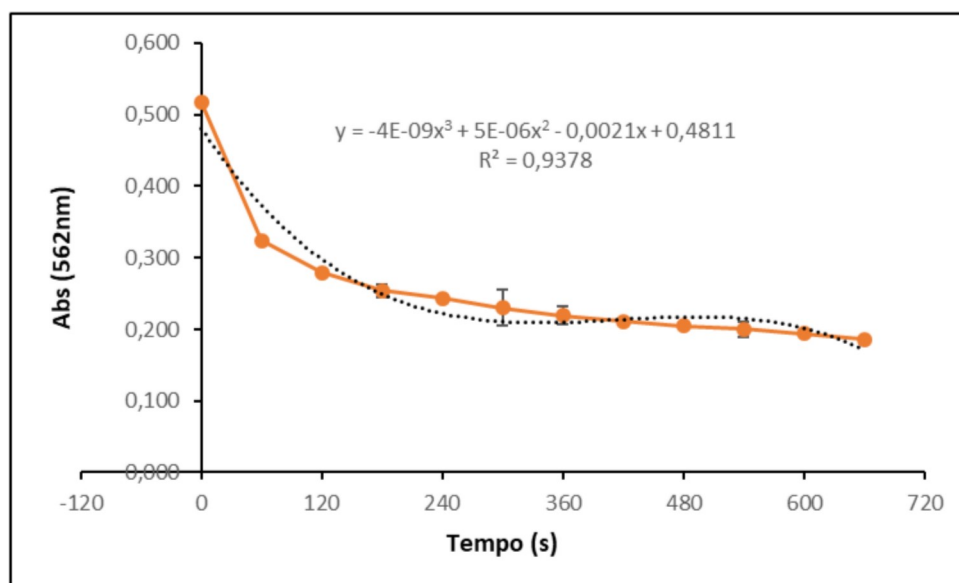
E. coli, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *B. subtilis* foram sensíveis nas duas maiores concentrações avaliadas do extrato de carotenóides produzido por *R. glutinis* URM 6692 (2,50 e 5,00 μg de carotenóides/mL). Além disso, todas as bactérias testadas apresentaram sensibilidade maior que 50% na presença do extrato na concentração de 2,50 μg de carotenóides/mL, sendo esta portanto, caracterizada como a concentração inibitória mínima (CIM).

Na tabela 1, é possível perceber que a taxa de inibição para *E. coli* e *S. aureus* foi maior quando a maior concentração do extrato foi utilizada (5,00 μg de carotenóides/mL), sendo 63,2% e 56,6%, respectivamente, indicando que quanto maior for a concentração do extrato utilizada no meio, maior será a inibição exercida contra esses patógenos. No entanto, a CIM (2,50 μg de carotenóides/mL) promoveu melhor efeito inibitório sobre *K. pneumoniae* seguida de *B. subtilis*, com 53,9% e 51,2% de inibição, respectivamente. Assim, ao inibir o crescimento de bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) e gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*), o extrato de pigmentos produzidos por *R. glutinis* URM 6692 apresentou um amplo espectro de atuação antimicrobiana.

Tabela 1. Percentual médio de inibição apresentado pelo extrato de pigmentos carotenóides obtidos de *R. glutinis* URM 6692 (1,25 a 5,0 µg/mL) frente a quatro diferentes estirpes de bactérias patogênicas após 24 h do contato inicial.

Estirpes	Percentual Médio de Inibição (%)		
	Concentração do extrato de carotenóides (µg/mL)		
	5,00	2,50	1,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	56,6 ± 10,6	54,5 ± 0,0	17,6 ± 2,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	50,4 ± 9,2	51,3 ± 2,4	0,0 ± 17,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	63,2 ± 5,7	59,8 ± 5,5	35,6 ± 3,5
<i>Klebsiela pneumoniae</i> ATCC29665	52,4 ± 11,8	53,9 ± 9,7	31,7 ± 9,9

Figura 1. Cinética de consumo do radical DPPH frente ao extrato de pigmentos carotenóides obtidos de *Rhodotorula glutinis* URM 6692 na concentração final de 12,5 µg/µL.



A atividade antioxidante do extrato de carotenóides obtido de *R. glutinis* URM 6692 foi determinada por meio do potencial de sequestro do radical livre DPPH ao longo de 10 minutos, consumindo um total de 62,5% do radical, quando disponível na concentração final de 12,5 µg de carotenóides/µL. A partir da Figura 1 é possível avaliar o potencial de sequestro de radicais de DPPH ao longo do tempo. Já nos primeiros 60 segundos, os carotenóides do extrato foram capazes de converter cerca de 37,5% do DPPH presente na amostra, representando um total de 59,9% da capacidade antioxidante apresentada pelo mesmo extrato ao final de 10 minutos.

Discussão

Este estudo demonstrou que os pigmentos carotenóides produzidos por *R. glutinis* URM 6692 apresentaram importantes efeitos biológicos valorizados pela indústria (antioxidante e antimicrobiano). β -caroteno, toruleno e torularrodina formam um grupo de pigmentos frequentemente sintetizados por *Rhodotorula* spp., porém em proporções que dependem da espécie e de fatores ambientais, como por exemplo, constituintes do meio de cultivo, temperatura, luminosidade bem como o tipo de processo desenvolvido (ZOZ et al., 2015; MATA-GOMEZ et al., 2014 e EL-BANNA et al., 2012). Isto sugere que, a utilização do soro de queijo coalho e a associação adequada das condições de cultivo realizada pelo planejamento fatorial afetaram a biossíntese de carotenóides de *R. glutinis* URM 6692, de modo que as proporções de β -caroteno, toruleno e torularrodina presentes no extrato, apesar de desconhecidas, assim como a combinação delas, possivelmente contribuíram para os efeitos antimicrobiano e antioxidante evidenciados.

Hanachi & Naghavi (2016), Yoo et al. (2016), Keceli et al. (2013) relataram resultados semelhantes aos efeitos inibitórios frente a micro-organismos patogênicos

encontrados neste estudo, confirmando o potencial antimicrobiano tipicamente apresentado pelo extrato de carotenóides de *Rhodotorula* spp. como uma característica própria do gênero. A bactéria mais sensível aos carotenóides de *R. glutinis* UMR 6692 foi a *E. coli*, seguida de *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *B. subtilis*, patógenos comumente associados à infecções alimentares no homem (LIU et al., 2019) e à casos de mastite em animais de produção (ARUNAVA et al., 2019), auxiliando na segurança dos alimentos.

Caracterizado por um mecanismo de transferência de elétrons entre o carotenóide e o radical livre (HUANG et al., 2005), neste estudo a atividade antioxidante do extrato foi determinada utilizando o ensaio DPPH. A capacidade antioxidante do extrato de carotenóides de *R. glutinis* URM 6692 cultivado em soro de queijo coalho foi de 62,5%, enquanto em estudo realizado por Yoo et al. (2016), o extrato de carotenóides de *R. mucilaginosa* AY-01 cultivado em meio de cultivo tradicional foi de 31%. Assim, diferentes proporções dos mesmos carotenóides no extrato de diferentes espécies resultam em diferentes efeitos.

Carotenóides microbianos, suas propriedades bioativas, tendências e possíveis aplicações biotecnológicas são temas frequentemente relatados em revisões e artigos de pesquisa, tendo em vista a sua importância para a indústria e para o mercado global (RODRIGUÉZ-CONCEPCION et al., 2018; KOT et al., 2016; MATA-GOMÉZ et al., 2014; TULI et al., 2014). Ao apresentar duas propriedades tipicamente encontradas em conservantes de alimentos, prevenindo sua deterioração e a perda de suas características nutricionais (INETIANBOR et al., 2015), associadas ao seu alto poder colorante, os carotenóides de *R. glutinis* URM 6692 podem servir como uma opção de aditivo alimentar natural.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que pigmentos carotenóides produzidos por *R. glutinis* URM 6692 cultivado com co-produtos da indústria de laticínios podem inibir significativamente o crescimento de bactérias patogênicas, além demonstrar plena capacidade de proteger o organismo dos danos causados por radicais livres, atuando como um satisfatório agente antioxidante. Assim, o uso dos pigmentos carotenóides de *R. glutinis* URM 6692 podem assegurar a preservação das características nutricionais dos alimentos, possibilitando a sua aplicação na indústria alimentícia como uma alternativa natural aos corantes e conservantes quimicamente sintetizados. Contudo, experimentos futuros são requeridos para identificar outras atividades biológicas, assim como verificar outras possíveis aplicações apresentadas pelo extrato de pigmentos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro através da bolsa concedida para a realização deste estudo.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse para a publicação deste artigo.

Referências

ANGUS, A.; WESTBROCK, G. Top 10 Global Consumer Trends 2019. Euromonitor International. 2019. Disponível em: <http://go.euromonitor.com/rs/805-KOK->

719/images/wpGCT2019-

v0.5.pdf?mkt_tok=eyJpIjoiWmprNFItVXhPVFkwTIRJdyIsInQiOiJWcE9ob0ZhMjlicVdDNWtMbKxCSUdsSGdEMzJ2Z1RFb3B5VE1Ub2lyTIZLRGVTT1dldHVkSVRXSkRhYUozbHVsSmJ2UWVZQU54d2FqYTB5VUI1WFFtMGdUck5maGw2OWxsaTBZZ21jWTVYdVZldTVpM2UrU056SmFMcnhtbUJvUyJ9. Acesso em: 26 fev. 2020.

BBC RESEARCH. BCC Research Report Overview: The Global Market for Carotenoids. 2018. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>>. Acesso em: 11 set. 2019.

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

DAS, A. et al. Prevalence of bacteriocin-producing *Lactobacillus*, food spoilage, and bovine mastitis-causing bacteria in commercial foodstuffs. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 13, n. 3, p. 193-206, 2019.

EL-BANNA, A. A., EL-RAZEK, A. M. A., EL-MAHDY, A. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 64-71, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION. Codex Alimentarius. General Standard for Food Additives (Codex Stan 192-1995), 2016. Disponível em: http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf. Acessado em 26 fev. 2020.

HANACHI, P.; NAGHAVI, F. S. 2016. Evaluation of Antioxidant Activity of *R. Slooffiae*, *R. Mucilaginosa* Extracts. **Electronic physician**, v. 8, n. 10, p. 3110–3115, 2016.

HOU, J.; CUI, H.-L. In Vitro Antioxidant, Antihemolytic, and Anticancer Activity of the Carotenoids from Halophilic Archaea. **Current Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 266–271, 2017.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1841–1856, 2005.

INETIANBOR, J.E., YAKUBU, J.M., EZEONU, S.C. Effects of food additives and preservatives on man - a review. **Asian Journal of Science and Technology**, v. 6, n. 02, p. 1118-1135. 2015.

KOT, A. M. et al. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, p. 6103–6117, 2016.

LIU, Y. et al. Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 9p, 2019.

MATA-GOMÉZ, L.C. et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, 12 p., 2014.

RADDADI N, CHERIF A, DAFFONCHIO D, NEIFAR M, FAVA F. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 7907–7913, 2015.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, v. 70, p. 62-93, 2018.

TULI, H.S. et al. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4669–4678, 2015.

ZOZ, L. et al. Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, 278-288, 2015.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As condições de cultivo são fatores que podem determinar o sucesso de um bioprocesso para a produção de carotenóides. Características bioquímicas apresentadas por micro-organismos provenientes de ambientes hostis podem ser potencializadas ao se disponibilizar condições físicas e nutricionais cujas interações possam beneficiar e direcionar a produção do metabólito desejado. Com isto, os experimentos desenvolvidos até aqui permitiram chegar às seguintes conclusões:

- A redução dos custos de produção pode ser alcançada ao utilizar o soro de queijo de coalho produzido diariamente pelas indústrias de laticínios do agreste pernambucano para obter carotenóides e outros bioativos naturais de alto valor agregado, podendo atuar como um insumo alternativo para as indústrias biotecnológicas de Pernambuco;
- Todas as leveduras estudadas apresentaram habilidades para crescimento em meio de cultivo a base de soro de queijo de coalho;
- O soro de queijo de coalho promoveu a carotenogênese em todas as leveduras *Rhodotorula* utilizadas neste estudo;
- *R. glutinis* URM 6692 foi a estirpe que melhor se adaptou ao meio soro de queijo de coalho, atuando de forma eficaz na produção dos pigmentos e contribuindo para a redução dos custos com o consumo de substrato;
- A produção dos carotenóides por *R. glutinis* URM 6692 independe da produção de biomassa;
- O planejamento experimental permitiu que as condições de cultivo fossem ajustadas de modo a garantir a maior produção volumétrica de carotenóides, com um baixo consumo de substrato e maior produtividade.
- Os pigmentos carotenóides extraídos de *R. glutinis* URM 6692 cultivada em soro de queijo coalho apresentam potencial antimicrobiano e antioxidante adequados para a sua aplicação na indústria alimentícia atuando como colorante e conservante de alimentos.

Essas considerações demonstram que a realização de estudos com o objetivo de manipular as condições ambientais para o crescimento microbiano é essencial quando se deseja obter melhores resultados. Assim, a partir do desenvolvimento de

um bioprocesso eficiente é possível garantir maior sucesso quando da sua aplicação na indústria, sobretudo, na indústria de alimentos.

ANEXOS

1. Produção científica e extensionista

RESUMOS SIMPLES

COSTA, B.A.M.; SILVA, S.R.S.; COSTA, R.M.P.B.; PORTO, A.L.F. **PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS POR FUNGOS A PARTIR DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO MEIO DE CULTURA.** V Encontro Pernambucano de Micologia: Diversidade Fúngica do Nordeste – A micologia pernambucana nos quatro cantos do país. Recife. 2019.

COSTA, B.A.M.; SILVA, S.R.S.; HERCULANO, P.N.; COSTA, R.M.P.B.; PORTO, A.L.F. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DO LÍQUIDO METABÓLICO DE *Rhodotorula* UTILIZANDO SORO DE QUEUO COALHO COMO SUBSTRATO.** XVIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Ciência e Tecnologia para o Fortalecimento da Educação. Recife. 2018.

SILVA, Q. J.; SILVA, S.R.S.; SILVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; OLIVEIRA, V.M. **PESCADO COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENZIMA FIBRINOLÍTICA PARA A INDÚSTRIA BIOMÉDICA.** I Jornada De Biomedicina FBV Devry- Atualização e promoção da saúde. 2017.

SILVA, J.C.; ROCHA, F.R.B.; SILVA, Q.G.; SILVA, S.R.S.; OLIVEIRA, V. M. **ENZIMA Do PESCADO EMPREGADA NA CICATRIZAÇÃO: FONTE ALTERNATIVA E AGREGAÇÃO DE VALOR AO PRODUTO PESQUEIRO.** I Jornada De Biomedicina FBV Devry- Atualização e promoção da saúde. 2017.

SILVA, S.R.S.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, Q.G.; SILVA, J.C.; OLIVEIRA, V.M. **CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA - UMA BREVE REVISÃO.** I Jornada De Biomedicina FBV Devry- Atualização e promoção da saúde. 2017.

SILVA, A.A.; SILVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, Q.G.; SILVA, S.R.S.; OLIVEIRA, V.M. ***Cryptococcus neoformans* E SUA IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA.** I Jornada De Biomedicina FBV Devry- Atualização e promoção da saúde. 2017.

SILVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; SILVA, Q.G.; OLIVEIRA, V.M. **PARASIToses EM CRIANÇAS ADQUIRIDAS ATRAVÉS DA ÁGUA.** I Jornada De Biomedicina FBV Devry- Atualização e promoção da saúde. 2017.

SILVA, Q.G.; SILVA, S.R.S., SILVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; OLIVEIRA, V.M. **PESCADO COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENZIMA FIBRINOLÍTICA PARA A INDÚSTRIA BIOMÉDICA.** I Jornada De Biomedicina FBV Devry- Atualização e promoção da saúde. 2017.

MELO, G.J.S.; CÂRVALHO, M.H.; SILVA, S.R.S.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, Q.G, OLIVEIRA, V.M.; PORTO, A.L.F. **PRÁTICA DE BIOQUÍMICA: DOSAGEM DE**

ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM EXTRATO BRUTO DE *Eucinostomus gula*. XVII Jornada De Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco. DISSEMINANDO A CULTURA ATRAVES DO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE. RECIFE. 2017.

MELO, G.J.S.; CARVALHO, M.H.; SILVA, S.R.S.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, Q.G.; OLIVEIRA, V.M.; PORTO, A.L.F. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MATERIAL PROTÉICO EXTRAÍDO DE VISCERAS DE *Cichla ocellaris*.** XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco. DISSEMINANDO A CULTURA ATRAVÉS DO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. Recife. 2017.

RESUMOS EXPANDIDOS

COSTA, B.A.M.; SILVA, S.R.S.; COSTA, R.M.P.B.; PORTO, A.L.F. **BETACAROTENO: PROPRIEDADES E IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE HUMANA.** II Curso de Inverno em Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2019.

OLIVEIRA, V.M.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; SILVA, Q.J.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. **COLÁGENO DE PELE DE PEIXE: ISOLAMENTO, BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES.** In: V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018, Recife. Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018.

SILVA, J.C.; SILVA, Q.J.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; OLIVEIRA, V.M.; PORTO, A.L.F. **BIOQUÍMICA DO COLÁGENO E SUA UTILIZAÇÃO PELA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS – UMA BREVE REVISÃO.** In: V Simpósio De Morfologia E Fisiologia Animal, 2018, Recife. Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018.

OLIVEIRA, V.M.; SILVA, J. C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; SILVA, Q. J.; NASCIMENTO, T. P.; PORTO, T.S.- P. **POTENCIAL FIBRINOLÍTICO DE RESÍDUOS DO PESCADO.** IN: V SIMPOSIO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL, 2018, Recife. Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018.

SILVA, J.C.; SILVA, Q.J.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; SANTOS, S.L.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; OLIVEIRA, V.M. **EXTRAÇÃO DE COLAGENASE DE PEIXES NEOTROPICAIS E SEU POTENCIAL FISIOLÓGICO.** In: V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018, Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018.

TRABALHOS COMPLETOS

OLIVEIRA, V.M.; SLVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; SILVA, Q.J.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.N.; NASCIMENTO, T.P.; CUNHA, M.N.C.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. **COLLAGEN OF PEACOCK BASS SKIN AS POTENTIAL SOURCE FOR THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY IN THE PRODUCTION OF PEPTIDES.** 5º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica. Recife. 2017.

SILVA, M.F.; SILVA, O.S.; OLIVEIRA, V.M.; SILVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; PORTO, T.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.N. **EXTRAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus* sp. UCP1279 UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS**. 5º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica. Recife. 2017.

PALESTRA

Ministrante da Palestra intitulada **BIOTECNOLOGIA DE COMPOSTOS BIOATIVOS: PIGMENTOS MICROBIANOS**. Ciclo de Palestras do "Quinta Ciência" - Bloco Biotecnologia e Produção. PET - Biologia, Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2017.

AVALIAÇÃO DE TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Participante na categoria de AVALIADOR(A) DE E-PÔSTER durante a **XVIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (JEPEX 2018)**, realizada no período de 2018.

Participante na categoria de AVALIADOR(A) ONLINE durante a **XVIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (JEPEX 2018)**, realizada no período de 2018.

Participante na categoria de AVALIADOR(A) DE E-PÔSTER da **XVII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO. DISSEMINANDO A CULTURA ATRAVÉS DO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE**. nas áreas de BIOLOGIA GERAL, MEDICINA VETERINARIA E MICROBIOLOGIA, realizada no período de 17 a 19 de outubro em Recife/PE. 2017.

Participante como AVALIADOR(A) na VIII Mostra do Laboratório de Ensino de Ciências Biológicas (LecBIO), intitulada **BIOLOGIA: DOCÊNCIA, EXPERIÊNCIAS E SABERES**, realizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/PE, nos dias 17 e 18 de abril de 2018.

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Participante ouvinte do **I SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, realizado na Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2019

Participante ouvinte do **I ENCONTRO PERNAMBUCANO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA: CONHECENDO PERNAMBUCO** realizado pela Academia Pernambucana de Ciências. Recife, 2019.

Participante da **1ª Jornada de Biomedicina FBV DeVry- ATUALIZAÇÃO E PROMOÇÃO DA SAÚDE**. Recife, 2017.

PARTICIPAÇÃO EM CURSOS LIVRES

Participante do **CURSO DE NANOENCAPSULAMENTO** ministrado pelo Prof. Dr. Lorenzo Pastrana do International Iberian Nanotechnology Laboratory e promovido

pelo Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Nov/2019.

Participante do **CURSO DE BIOTECNOLOGIA MICROBIANA** ministrado pelo Prof. Dr. José Antônio Couto Teixeira e ofertado pelo Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dez/2018.

Participante do **CURSO PARA OPERAÇÃO DE BIORREATORES DE BANCADA**, promovido pelo Laboratório Nacional de Tecnologia do Bioetanol - CTBE/CNPEM, Campinas. Out/2018.

PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE EXTENSÃO

Participante como membro integrante do projeto de extensão intitulado “**QUIZ METABÓLICO: APRENDENDO BIOQUÍMICA E FISILOGIA NO ENSINO FUNDAMENTAL ATRAVÉS DE JOGOS DE PERGUNTAS-RESPOSTAS**”. Desenvolvido na Universidade Federal Rural de Pernambuco e executado na Escola Heróis da Restauração. Recife. 2019.

Participante como membro integrante do projeto de extensão intitulado “**CURSO DE EXTENSÃO EM PROTEÍNAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS E SUAS APLICAÇÕES FISIOLÓGICAS**”. Desenvolvido e executado na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2019.

2. Formação de recursos humanos

MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO (LATO SENSU)

MARIA GORETTI VAREJÃO DA SILVA. **Salmonella spp. EM QUEIJO COALHO - UMA BREVE REVISÃO**. 2018. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Microbiologia) - Faculdade Frassinetti do Recife. Orientador: Sabrina Roberta Santana da Silva.

3. Normas da revista *Biotechnology Letters*

GUIDANCE NOTES FOR THE PREPARATION OF PAPERS FOR BIOTECHNOLOGY LETTERS

Authors should check the relevancy of their work for inclusion in *Biotechnology Letters* by reading the Aims and Scope that are printed in each issue of the journal and are also available from our website <http://www.springeronline.com/journal/10529>). *To ensure relevancy, authors should check if citations of relevant papers previously published in this journal are included in their submitted paper.*

We urge you to read these Notes very carefully. We need your paper to have the minimum number of errors so that it can be published immediately. The Editors cannot undertake extensive rewriting of poorly presented papers as their priority is for the rapid publication of high quality papers.

You will need to produce a perfect copy of your paper that is ready for printing from your electronic submission. Only the minimum amount of editing can be done on the final manuscript. Detailed *Instructions to Authors* are available on the website:

<http://www.springeronline.com/journal/10529>

If your first language is not English, we would urge you to seek help from someone who is fluent in English. The use of professional paper writing agencies is strongly encouraged where authors may have major problems in writing their work clearly or concisely. It will also help if you consult a recent issue of the Journal to see our preferred style of writing and presentation of information. This is available online at: <http://www.springeronline.com/journal/10529>

Overall length The maximum length of a published paper in the Journal is usually six (6) *printed* pages. Papers having over 12 *typed* pages of text are usually too long. Tables, Figures and the Reference List all count towards the final length of your paper.

Please ensure that **all** pages, including those for the reference list, tables and figures, are numbered. Lines on each page should also be numbered either sequentially throughout the entire paper or on each individual page. All material must be in double-spaced typing; this includes Tables and the presented data plus Figure legends. There are no exceptions.

Supporting Information Lengthy information that is not essential for the understanding of the paper can be given as Supplementary Tables and Figures. These are printed on-line but will not be printed in the Journal. Authors should consider using these for information such as DNA and protein sequences, including sequences of primers used for PCR, plasmids used, information regarding the identification of new microbial isolates, ancillary data about protocols or minor results. These will not be counted as part of the length of the final paper. This section is placed immediately before the list of references. Citation of the supplementary data

must be given in the text as “Supplementary Table 1”, “Supplementary Figure 1” etc and not as “Table S1” or “Figure S1”.

Section of the Journal Please specify at the top of the title page the section to which your paper should be allocated – see Instructions to Authors.

Title This must be accurate and informative; please do not use phrases such as “The effect of...”, “Studies on...” etc. Specify the organism or cell system you have used. We do not publish papers that have a sequence number.

Abstract A structured Abstract is to be provided for research papers.

Objectives A single sentence of up to 35 words should indicate the scope and reasons for the work.

Results This must be both informative and concise. Do not use phrases such as “In this study...”, “We have carried out a study into... and the results are reported here”, “This paper describes” or “These experiments are evaluated here...”. Also do not use words such as “high”, “low”, “rapid”, “slow”, “increased” etc. but give the key quantitative results; what may be a “high” value to you may be a moderate one to someone else. **Such words have no scientific value.** All non-standard abbreviations must be defined. Do not include references unless essential and then the reference must be given in full. The overall length should be no longer than 120 words and be given as a single paragraph.

Conclusions a single sentence of up to 35 words to give the principal conclusion. Abstracts for reviews can be given as a single paragraph not exceeding 150 words.

Key words: 4-6 words or phrases suitable for indexing should be given.

Introduction Please keep this as short as possible (usually no more than 300-350 words); do not give a minireview of the literature; give key references to recent, relevant publications; historical references are rarely useful. Space is precious - keep it for your results.

Methods Give concise information concerning the key protocols only. Avoid describing routine or trivial matters such as how the micro-organisms are maintained, how and when the cultures were sampled. The latter information is easily understood from the tables or figures. Suppliers of chemicals and manufacturers of equipment should only be given if these are not generally available or are in some way unusual or are crucial for success. Suppliers such as Sigma-Aldrich etc. are given without addresses. There is no need to give references to standard procedures, e.g. Lowry or Bradford methods etc. We encourage authors to place as much relevant information in the footnotes and legends of their tables and figures to increase understanding of these illustrations.

Results Results, given in tables and figures, do not need to be described again at length in the text. This is a very common fault and leads to Results sections often being too long. Focus the reader’s attention on your key results. The Results and Discussion sections may be combined. An ideal Results section might simply say: “The results are given in Tables 1 and 2 and further details are shown in Figures 1 and 2.”

Discussion Put your key results into the context of current information but do not repeat a description of the results. Also avoid unwarranted or unsupported speculations. Keep your discussion short and focused on explaining the significance of your results.

Tables These should be given, together with their title, on a separate sheet for each table at the end of text and after the References. Their lay-out should be suitable for printing as either single column (7.5 cm) or double column (16 cm) width. Avoid vertical rulings (lines) and keep horizontal rulings to a minimum. Please ensure 100% relative values are given as absolute values in a footnote. Do not quote values beyond the accuracy (or inaccuracy) of the methods being used. This is a very common fault. State clearly how many times each complete experiment was done and how many times each individual determination was done. Understanding the likely reproducibility of your measurements is of crucial concern. Data given in Tables and Figures should be understandable without recourse to the text: you can add key information regarding experimental procedures in footnotes and omit such details from the Methods section. It is essential that all non-standard abbreviations used in tables and figures are re-defined. Indicate the approximate position of the Table by a note in the margin of the text or between paragraphs.

Figures Make sure these will reproduce satisfactorily: lines, symbols and lettering must be clear, of equal blackness and are thick enough to be easily read when reproduced at a single column width (7.5 cm). Please do not use color when the figure can be easily printed in black and white. Please give adequate footnotes so that figures can be understood without recourse to the text. Please ensure 100% relative values of data are also given in absolute values in the legend. Please avoid giving figures with large areas of blank space. Each figure should be given on a separate sheet with their number clearly stated. The captions (legends) should be grouped together and placed on another separate sheet that follows the Tables but precedes the Figures.

Please indicate the approximate position for the figure with a note given in the margin of the text or between paragraphs.

Photographs These must be high-contrast and be in black and white that will show the key details when printed. Colour photographs may be printed without charge if, in the opinion of the Editor, colour will enhance the illustration. Do not copy print-outs from recorders or computers attached to instruments - these are rarely of publishable quality. Do not scan-in material as it is impossible for such material to be processed later. Avoid making black and white copies from coloured photographs - these do not have sufficient contrast. For photomicrographs, scale bars must be added on the print itself and the size of the bar then given in the legend. Again, please ensure that the photographs are appropriate for printing at a single column width (7.5 cm) or exceptionally at double width. Please remove all extraneous material from the photograph or photomicrograph. Make sure that all that will be printed is essential and the photograph cannot be made smaller.

Gene sequences These are no longer published by the Journal and should be lodged in an appropriate database. The accession number of the sequence should

be quoted in the manuscript. If parts of these sequences are relevant to the paper, then they may be given as Supporting information – see above.

Compliance with Ethical Standards Section Please add a “Compliance with Ethical Standards” section before the References as described in the Instructions for Authors “Compliance with Ethical Standards”, “Disclosure of potential conflicts of interest”, Research involving human participants and/or animals” “Informed Consent”? Sample sentences are given below:

Compliance with Ethical Standards

Funding: This study was funded by X (grant number X). (optional - could be left out in case no funding was received)

Conflict of Interest: Author1 declares that he/she has no conflict of interest.

Author2 declares that he/she has no conflict of interest. ...

Ethical approval:

In case animals were involved:

“All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

And/or in case humans were involved:

“All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

or

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

or

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

References No more than 15 are usually necessary; if more, then you are probably over-reviewing the literature and please consider if the number can be decreased. Please use the correct style - see Notes to Authors. **Please ensure the references in the text match the ones given in the list and vice versa.**

Common errors all too frequently made.

Reproducibility of results The number of times a complete experiment has been carried out should be given together with the number of samples analysed on each occasion. This should be indicated either in the Methods or in the Tables or Figures. The range of values should be indicated by $\pm$ in a table, or by an error-bar in a figure.

Accuracy All values should be quoted within the experimental accuracy of the protocol being used taking into account the type of analysis and instrumentation being used. Rarely can values given to four or more significant figures be justified. Please avoid the use of non-significant zeros in numerical values (e.g. write 10 g glucose NOT 10.0 g glucose, or even 10.00 g glucose, etc.).

Please avoid using 'reduce' when you mean 'decrease' or 'lower' particularly in the context where there may be (bio)chemical reductions.

Units: please always leave a space between the number and the unit; e.g. 100 mM **not** 100mM.

Do not use a fold-decrease (e.g. a 5-fold decrease) as the meaning of this is never clear. Use % decrease instead.

Avoid 'ppm' and, where possible, '%' but give as mg/l (mg l⁻¹) or g/l (g l⁻¹) etc. SI units and permitted alternatives are to be used. Use correct abbreviations for standard units: h not hr, g not gr etc. If you use % for a concentration, always state if this is v/v, w/v, v/w or w/w. Abbreviations are never made plural. Do not use normalities (N) for concentrations of acids or bases; molarities (M) should be given instead. Please note that the journal prefers the use of M (and mM etc.) rather than mol l⁻¹ or mmol l⁻¹.

Avoid redundant words or phrases such as 'a blue colour', 'at a temperature of 30°C', 'at a wavelength of 340 nm', 'at a concentration of 2 g/l *etc.*' (Blue is a colour and does not need stating!) Also phrases such as 'It was observed that...', 'Previous published research has established that...' or 'It can be seen from Table 2 that...' are also redundant and may, without exception, be deleted or decreased to 'Table 2 shows that...'. Also words such as 'successfully' as in "The gene was successfully cloned..." and 'recent' as in "Recent research..." can also be deleted without affecting the clarity of the writing.

Concentrations are given as 10 g ethanol/l not 10 g/l ethanol. Mixtures of materials are given as Tris/HCl, chloroform/methanol (2:1, v/v) or methanol/water/acetic acid (60:35:5, by vol.).

For presentation of cell growth, please give as dry weight values for microbes, plant and animal cell cultures. Values as wet weights are not acceptable. Optical densities (**not** absorbancies) are given as OD values (e.g. OD600) and must be converted to the corresponding cell dry wt values. Please do not say "exponential (or logarithmic) growth" unless you have clear data to support that such rates were achieved. Arithmetic growth rates are usually attained in most cell growth systems in spite of many statements to the contrary.

Please use non-standard abbreviations sparingly: these confuse more often than not and are unlikely to save more than 1 or 2 lines of space in the whole paper. Only use if they are replacing lengthy phrases or chemical names.

November 2018

Disponível em:

https://static.springer.com/sgw/documents/1595226/application/pdf/Guidance%20Notes%20for%20Authors_Nov_18.pdf

4. Normas da revista *World Journal Microbiology and Biotechnology*

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Important note:

- A copy of the **author checklist**, appropriately checked, must accompany every submission.

[Author Checklist \(Download docx, 86 kB\)](#)

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

Title page

Title Page

Please use this **template title page** for providing the following information.

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published. For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'. If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

To be used for non-life science journals

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

To be used for life science journals + articles with biological applications

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)

Consent to participate (include appropriate statements)

Consent for publication (include appropriate statements)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Additional request Title page

Graphical Abstracts

You are welcome to submit a graphical abstract consisting of an image (figure, scheme) representing the contents of the article graphically. The use of color is strongly encouraged here.

Format

Manuscripts should be divided into the following sections:

- Title page
- Abstract
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion; the Discussion section must not recapitulate the Results
- Acknowledgements
- References
- Figure legends
- Figures
- Tables

Results and Discussion should be separated.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(Download zip, 188 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title. For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (Download zip, 3 kB)

Tables

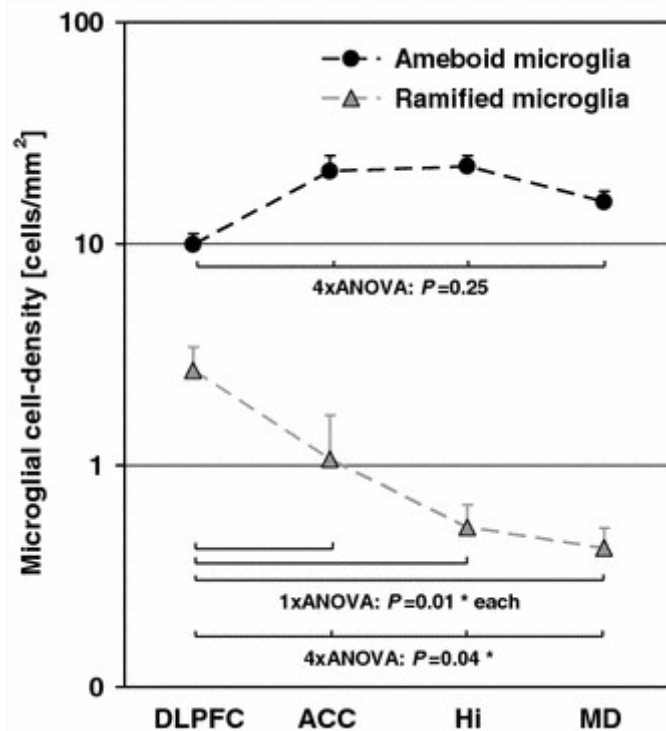
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

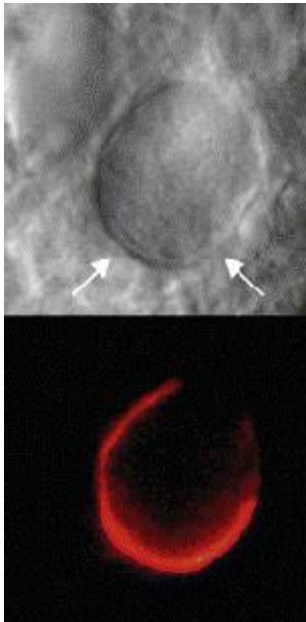
Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

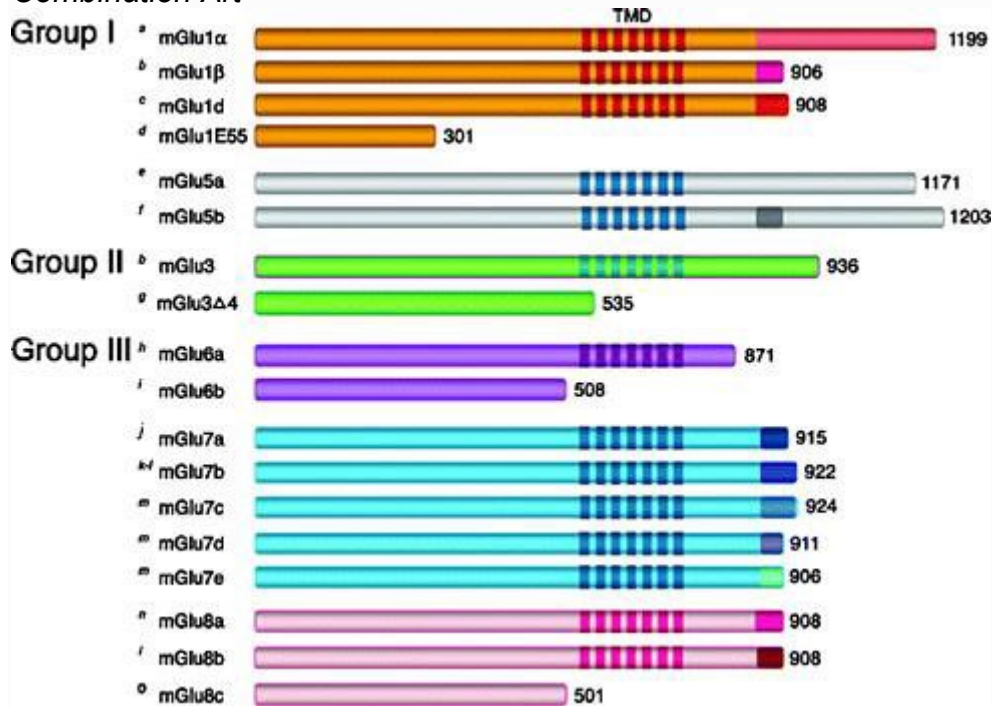
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Availability of Materials

By publishing the authors agree that any microbial strains, plasmids, viruses, and other materials such as prions or cell lines newly described in the articles are available in a timely fashion, free or at reasonable cost, to members of the scientific community for noncommercial purposes, if necessary via an appropriate Materials Transfer Agreement between the interested parties.

We strongly encourage the authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the manuscript. The authors should indicate laboratory strain designations and donor source when the culture or subculture specimen is distributed by individuals.

Nucleotide and Amino Acid Sequences

Any nucleotide or amino acid sequences that were determined for the first time should be deposited to a public database, such as GenBank, EMBL or DDBJ, and the accession numbers should be included in a separate paragraph in the Materials and Methods section. Sequence data must be publicly available no later than the publication date of the article.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be

explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in

the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al, PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations. Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements.

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order,
APA Science Student Council 2006

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals. Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work.

Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of

a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on **Informed Consent**.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1^{tm1a(KOMP)Wtsi}* **RRID:MMRRC_055641-UCD**

Cell Line: RST307 cell line **RRID:CVCL_C321**

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, **RRID:AB_2722109**

Plasmid: mRuby3 plasmid **RRID:Addgene_104005**

Software: ImageJ Version 1.2.4 **RRID:SCR_003070**

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for,

with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions” and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract. Purely observational trials will not require registration.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on **a title page that is separate from the manuscript** with a section entitled “**Declarations**” when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements. **Please use the following template title page for providing the statements.**

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers. Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

- Provide “**Ethics approval**” as a heading (see template)

Examples of ethics approval obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of C (Ethics approval number: ...).

Examples of a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples no ethical approval required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the

(identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found [here](#). ([Download docx, 36 kB](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on **a title page that is separate from the manuscript** with a section entitled “**Declarations**” when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors’ contribution statements. **Please use the template Title Page for providing the statements.**

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers. Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Provide “**Consent to participate**” as a heading

Sample statements consent to participate:

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

The patient has consented to the submission of the case report for submission to the journal.

Provide “**Consent to publish**” as a heading

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs. Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

Research Data Policy

A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality.

The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. Persistent identifiers (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper

For the following types of data set, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory:

Mandatory deposition	Suitable repositories
Protein sequences	Uniprot
DNA and RNA sequences	Genbank DNA DataBank of Japan (DDBJ) EMBL Nucleotide Sequence Database (ENA)
DNA and RNA sequencing data	NCBI Trace Archive NCBI Sequence Read Archive (SRA)
Genetic polymorphisms	dbSNP dbVar European Variation Archive (EVA)
Linked genotype and phenotype data	dbGAP The European Genome-phenome Archive (EGA)
Macromolecular structure	Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) Electron Microscopy Data Bank (EMDB)
Microarray data (must be MIAME compliant)	Gene Expression Omnibus (GEO) ArrayExpress
Crystallographic data for small molecules	Cambridge Structural Database

For more information:

[Research Data Policy Frequently Asked Questions](#)

Data availability

The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate.

Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- 1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- 2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- 3. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- 4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- 5. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available:

Data availability statements

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to Springer's MyPublication web page where you can confirm the publication of your article with open access under the Creative Commons Attribution License and indicate whether you wish to order offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

[English language tutorial](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

•
 为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
-

使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构 **Nature Research Editing Service** 和合作伙伴 **American Journal Experts** 即可提供此类服务。

教程

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- ・英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらう。
- ・英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。
- ・プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語の質を向上させます。**Nature Research Editing Service**と**American Journal Experts**の2つは弊社と提携しているサービスです。**Springer**の著者は、いずれのサービスも初めて利用する際には**10%**の割引を受けることができます。以下のリンクを参照ください。

英語のチュートリアル

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

英文校正サービスの利用は、投稿先のジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されると、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

영어 원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오:

- ・ 귀하의 원고의 표현을 명확히 해줄 영어 원어민 동료를 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- ・ 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주하는 실수들을 확인합니다.
- ・ 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. **Nature Research Editing Service**와 **American Journal Experts**에서 저희와 협약을 통해 서비스를 제공하고 있습니다. **Springer** 저자들이 본 교정 서비스를 첫 논문 투고를 위해 사용하시는 경우 10%의 할인이 적용되며, 아래의 링크를 통하여 확인이 가능합니다.

영어 튜토리얼 페이지

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저희측 편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.

Disponível em: <https://www.springer.com/journal/11274/submission-guidelines#Instructions%20for%20Authors>