



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

# BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS E INGREDIENTES ALIMENTÍCIOS UTILIZANDO FUNGOS

Autor: Alan Gomes Lima  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Mariana Buranelo Egea

**RIO VERDE - GO**  
**Julho – 2024**



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

## BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS E INGREDIENTES ALIMENTÍCIOS UTILIZANDO FUNGOS

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Linha de pesquisa: Pós-colheita e processamento de grãos e vegetais.

Autor: Alan Gomes Lima  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Mariana Buranelo Egea

**RIO VERDE - GO**  
**Julho – 2024**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

L732b Lima, Alan Gomes  
Biotransformação de produtos e ingredientes alimentícios  
utilizando fungos / Alan Gomes Lima ; orientadora Mariana Buranelo  
Egea. -- Rio Verde, 2024.  
52 f.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos ) -- Instituto  
Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2024.

1. Produtividade. 2. Fermentação. 3. Pigmentos naturais. 4. Fontes de  
carbono. 5. Influência do pH. I. Egea, Mariana Buranelo. II. Título.

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

### IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado)                  | <input type="checkbox"/> Artigo científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização)       | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação)                   | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Alan Gomes Lima

Matrícula:

2022102330740008

Título do trabalho:

Biotransformação de Produtos e Ingredientes Alimentícios Utilizando Fungos

### RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano:  /  /

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

### DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde - GO

Local

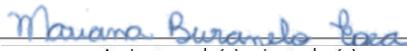
31 / 07 / 2024

Data



Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 70/2024 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO**  
**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Unidade do IF Goiano:	Campus Rio Verde	
Programa de Pós-Graduação:	Tecnologia de Alimentos	
Defesa de:	Dissertação	Defesa de número: 103
Data: 31/07/2024	Hora de início: 13:30h	Hora de encerramento: 18:00h
Matrícula do discente:	2022102330740008	
Nome do discente:	Alan Gomes Lima	
Título do trabalho:	Biotransformação de Produtos e Ingredientes Alimentícios Utilizando Fungos	
Orientadora:	Mariana Buranelo Egea	
Área de concentração:	Tecnologia e Processamento de Alimentos	
Linha de Pesquisa:	Pós-colheita e processamento de grãos e vegetais	
Projeto de pesquisa de vinculação	Torta de baru <i>Dipteryx alata</i> como substrato para produção do pigmento vermelho de <i>Monascus Purpureus</i> ATCC 36928 em cultivo submerso	
Titulação:	Mestre em Tecnologia de Alimentos	

Nesta data, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra Mariana Buranelo Egea (Presidente da banca), Prof. Dr. Ailton Cesar Lemes (Avaliador Externo) e Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira (Avaliador Externo) sob a presidência da primeira, em sessão pública realizada online - via google meet, para procederem a avaliação da defesa de dissertação, em nível de Mestrado, de autoria de **ALAN GOMES LIMA**, discente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Mariana Buranelo Egea, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação para, em 40 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de arguição dialogada. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, e procedidas às correções recomendadas, a dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGTA da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, esta ata perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60** (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de mestrado, e foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

### Decisão da banca: Aprovado

Esta defesa é parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna do IFGoiano.

Documento assinado eletronicamente por:

- Ailton Cesar Lemes, Ailton Cesar Lemes - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal do Rio de Janeiro (33663683000116), em 01/08/2024 10:22:46.
- Felipe da Silva Figueira, Felipe da Silva Figueira - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal do Oeste da Bahia (18641263000145), em 31/07/2024 16:20:24.
- Mariana Buranelo Egea, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/07/2024 16:06:16.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 11/07/2024. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 614081  
Código de Autenticação: 8f7b9ff8d5



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Rio Verde

Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970

(64) 3624-1000



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

## **Biotransformação de Produtos e Ingredientes Alimentícios Utilizando Fungos**

Autor: Alan Gomes Lima  
Orientadora: Mariana Buranelo Egea

TITULAÇÃO: Mestre em Tecnologia de Alimentos – Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos

APROVADO em 31 de julho de 2024.

Dr. Ailton Cesar Lemes  
Avaliador externo  
UFRJ

Dr. Felipe da Silva Figueira  
Avaliador externo  
Universidade Federal do Oeste da  
Bahia - UFOB

Dra. Mariana Buranelo Egea  
Presidente da banca  
IF Goiano/RV

Documento assinado eletronicamente por:

- Ailton Cesar Lemes, Ailton Cesar Lemes - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal do Rio de Janeiro (33663683000116), em 01/08/2024 10:21:40.
- Felipe da Silva Figueira, Felipe da Silva Figueira - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal do Oeste da Bahia (18641263000145), em 31/07/2024 16:19:47.
- Mariana Buranelo Egea, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/07/2024 16:12:31.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 31/07/2024. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 618645  
Código de Autenticação: 8a63b9de4f



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Rio Verde

Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970

(64) 3624-1000

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta dissertação, gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço imensamente à minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Mariana Buranelo Egea, por seu incansável apoio, orientação e incentivo ao longo deste processo. Sua expertise e sua dedicação foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À minha esposa, Maria Vitória Soares Lima, agradeço o amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores. Sua presença foi essencial para a realização deste sonho.

À minha mãe, Cibele Gomes Lima, e à minha avó, Margarida Teixeira Gomes, minha eterna gratidão por todo o carinho, apoio e incentivo ao longo da minha jornada acadêmica. Vocês são minhas maiores inspirações e pilares de força.

Agradeço também ao IF Goiano - Campus Rio Verde, por proporcionar um ambiente acadêmico de excelência e por todo o suporte oferecido durante minha formação.

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de turma e aos professores que contribuíram para a minha formação. Suas trocas de conhecimento, apoio e discussões foram essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Por fim, agradeço às instituições de apoio financeiro e estrutural que tornaram possível o desenvolvimento desta pesquisa: GFI Brasil, FAPEG (Processos 202310267000884 e 202310267001405), CNPq (Processo 308489/2020-9) e IF Goiano/PROPI (Processo 23216.000940.2022-92).

A todos, meu sincero muito obrigado!

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Alan Gomes Lima nasceu em 23 de setembro de 1995, em Ruy Barbosa, Bahia, filho de Cibele Gomes Lima. Formou-se em Engenharia de Biotecnologia pela Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Campus Luís Eduardo Magalhães, Bahia. Durante a graduação, sempre se interessou por bioprocessos e microbiologia, principalmente quando aplicados na solução de problemas nas áreas de saúde e alimentos. Em 2020, fez seu estágio de graduação no Instituto Butantan, uma renomada instituição de pesquisa e desenvolvimento. Posteriormente, trabalhou com fungos e bactérias aplicadas à agricultura, o que lhe proporcionou a oportunidade de se mudar para o estado de Goiás. Lá, conheceu o Programa de Pós- Graduação em Tecnologia de Alimentos oferecido pelo IF Goiano - Campus Rio Verde, onde deu continuidade a seus estudos e pesquisas. Em Goiás, Alan continuou trabalhando com fungos e bactérias aplicados ao campo, enquanto se dedicava às disciplinas do mestrado ao longo de 2022. No início de 2023, mudou-se para São Paulo, onde continuou atuando na área de Biotecnologia Industrial e Microbiologia aplicada à agricultura. Em 2024, ele teve a oportunidade de expandir sua carreira internacionalmente. Atualmente, reside e trabalha na Espanha, atuando na área de bioprocessos e biotecnologia industrial. Sua experiência internacional tem enriquecido ainda mais sua expertise e dado contribuições para o setor.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. OBJETIVOS .....	21
3. CAPÍTULO I – ALIMENTOS A BASE DE FUNGOS .....	22
3.1 Introdução .....	23
3.2 Fungos Filamentosos .....	25
3.3 .....	26
Tipos de processos utilizados na fabricação de produtos fungi-based .....	26
3.3.1 .....	26
Processo fermentativo como ferramenta para produção de ingredientes fungi-based .....	26
3.4 Fermentação de precisão e seu potencial para produção de insumos e ingredientes fungi based.....	30
3.5 .....	32
Fungos utilizados na fermentação de precisão .....	32
3.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
3.5.2 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	33
3.5.3 <i>Komagataella phaffii</i> .....	34
3.5.4 <i>Aspergillus</i> spp.....	34
3.5.5 <i>Trichoderma reesei</i> .....	35
3.5.6 <i>Fusarium</i> spp. ....	35
5.6 Uso de fermentação de precisão para a produção de ingredientes fungi-based .....	36
3.7 Fermentação de biomassa e potencial de produção de <i>single cell protein</i> .....	37
3.8 Perspectivas futuras .....	35
3.9 Referências .....	36
4. CAPÍTULO II – MEIOS À BASE DE MANITOL E PH ESTÁTICO SÃO CONDIÇÕES EFICIENTES PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTO VERMELHO DE <i>MONASCUS PURPUREUS</i> ATCC 36928 EM CULTIVO SUBMERSO.....	35
4.1 Introdução .....	36
4.2. Materiais e métodos .....	37
4.2.1 Microrganismos e Meios de Cultura.....	37
4.2.2 Cultivos de Erlenmeyer e Biorreator de Bancada.....	38
4.2.3. Produção de biomassa celular e pigmento vermelho extracelular.....	39
4.2.5. Análise Estatística.....	40
4.3. Resultados.....	40

4.3.1 Efeitos de Diferentes Fontes de Carbono na Produção de Biomassa Celular por <i>Monascus purpureus</i> em Frascos Agitados .....	40
4.3.2. Cultivo em um biorreator usando manitol como fonte única de carbono.....	44
4.3.3 Cálculo da Taxa Máxima de Crescimento Específico, Coeficiente de Produção de Pigmentos por Biomassa e Produtividade .....	47
4.4 Conclusões.....	48
4.5. Referências Bibliográficas.....	49

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Prospecção de trabalhos científicos que utilizaram fermentação fúngica como modificação de substratos para produção de ingredientes ..... 28

Tabela 2 - Prospecção de trabalhos científicos que utilizaram proteína de microrganismos de célula única para produção de ingredientes ou produtos alimentícios ..... 39

Tabela 3 - Diferença de cores absorvidas por espectrofotometria em 24 e 48 h sob diferentes fontes de carbono (MAN: manitol, GLU: glicose e SUC: sacarose) em cultivo submerso. .... 42

Tabela 4 - Taxa máxima de crescimento específico, coeficiente de produção de pigmento por biomassa e produtividade do pigmento vermelho *Monascus purpureus* sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH estático e variável do meio. 48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estruturas morfológicas dos fungos .....	26
<b>Figura 2</b> - Esquema da aplicação de métodos de precisão na fermentação de fungos .....	31
<b>Figura 3</b> - Esquema da aplicação da metodologia do DNA recombinante para geração de chassis microbiano e produção de moléculas de interesse. ....	33
<b>Figura 4</b> - Estrutura dos pigmentos produzidos pelas espécies <i>Monascus</i> . ....	36
<b>Figura 5</b> - Esquema de cultivo de <i>Monascus purpureus</i> . ....	38
<b>Figura 6</b> - Cultivo de <i>Monascus purpureus</i> após 48 h sob diferentes fontes de carbono.....	40
<b>Figura 7</b> - Biomassa de <i>Monascus purpureus</i> sob diferentes fontes de carbono. ....	41
<b>Figura 8</b> - Pigmento vermelho de <i>Monascus purpureus</i> sob diferentes fontes de carbono (MAN: manitol, GLU: glicose e SUC: sacarose) em cultivo submerso. ....	43
<b>Figura 9</b> - Produção de pigmento vermelho de <i>Monascus</i> sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH estático. ....	44
<b>Figura 10</b> - Biomassa de <i>Monascus purpureus</i> sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH estático. ....	45
<b>Figura 11</b> - Concentração de oxigênio dissolvido (OD). ....	46
<b>Figura 12</b> - (A) Produção de pigmento vermelho <i>Monascus</i> sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH variável do meio, e (B) taxa de produção de pigmento sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator. ....	47

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

$Y_p \left( \frac{AU}{g} \right)$ : Coeficiente de produção de pigmento por biomassa

$\mu_{\max}(h^{-1})$ : Velocidade específica máxima de crescimento celular

ANOVA: Análise da Variância

ATCC: *American Type Culture Collection*

BDA: Batata dextrose ágar

BOD: Demanda bioquímica de oxigênio

COD: Concentração de oxigênio dissolvido

DO: Densidade ótica

g/L: Gramas por litro

GLU: Glicose

MAN: Manitol

mL: Mililitros

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

OD: Oxigênio dissolvido

OVA: Ovalbumina

PF: Fermentação de precisão

RPM: Rotação por minuto

SSF: Fermentação em estado sólido

SUC: Sacarose

UA: Unidades de absorbância

UFC: Unidade formadora de colônia

v/v: Volume por volume

vvm: Volume de ar por volume de meio por minuto

$P \left( \frac{AU}{h} \right)$ : Produtividade

Nm: nanômetro

## RESUMO

LIMA, ALAN GOMES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, junho 2024. **Biotransformação de produtos e ingredientes alimentícios utilizando fungos.** Orientadora: Dra. Mariana Buranelo Egea. Coorientador: Dr. Leandro Pereira Cappato.

Os fungos têm grande capacidade e flexibilidade para um grande leque de aplicações industriais, devido à sua vasta biodiversidade e aos mecanismos bioquímicos de que dispõem. Eles podem ser aplicados em ramos como a saúde, com a produção de insulina humana pelo fungo *Aspergillus niger*, até a indústria de produtos de limpeza, com o uso do fungo *Trichoderma reesei*, e a indústria alimentícia, onde os fungos são utilizados como fontes de proteínas e substitutos de pigmentos sintéticos. Um exemplo notável é a utilização do fungo *Monascus purpureus*, que oferece uma alternativa aos corantes sintéticos, os quais estão associados a riscos à saúde humana. Com a previsão do aumento da população mundial para nove bilhões de pessoas até 2050, torna-se fundamental encontrar fontes alimentares e novos ingredientes que sejam sustentáveis e nutritivos. Neste trabalho, foi realizada uma revisão abrangente da literatura para identificar as aplicações mais recentes de fungos na indústria de alimentos, com ênfase no uso de diversos resíduos para a produção de alimentos à base de fungos. Além disso, foi conduzido um estudo específico com o fungo *Monascus purpureus* visando à produção de pigmento vermelho como substituto para corantes sintéticos. Este estudo avaliou diferentes fontes de carbono, como manitol, glicose e sacarose, e condições de pH constantes, alternando fases no cultivo líquido deste fungo para produção do pigmento vermelho de *Monascus* sp. Os resultados indicaram que o manitol, utilizado como única fonte de carbono, estimulou de maneira mais eficaz a produção de pigmento vermelho extracelular, alcançando concentrações significativas em menor tempo, tanto em cultivo em frascos quanto em biorreatores. A produção de pigmento atingiu 25 UA em 60 horas de cultivo em biorreator sob condições de pH estático em 7,0 em meio de cultivo utilizando manitol como única fonte de carbono, demonstrando o grande potencial do manitol como fonte de carbono para otimizar a produção de pigmento vermelho.

**Palavras-Chave: Produtividade, Fermentação, Pigmentos naturais, Fontes de carbono, Influência do pH, Biotecnologia de Alimentos**

## ABSTRACT

LIMA, ALAN GOMES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, June of 2024. **Biotransformation of Food Products and Ingredients Using Fungi.** Adviser: Dra. Mariana Buranelo Egea. Co-adviser: Dr. Leandro Pereira Cappato.

Fungi has demonstrated a great capacity and flexibility for a wide range of industrial applications, primarily due to their vast biodiversity. They can be applied in sectors ranging from healthcare, with the production of human insulin by the fungus *Aspergillus niger*, to the cleaning products industry, where the fungus *Trichoderma reesei* is used, as well as for food industry, where fungi serve as protein sources and substitutes for synthetic pigments. A notable example is the use of *Monascus purpureus*, which offers an alternative to synthetic dyes, often associated with health risks for humans. With the global population expected to reach 9 billion people by 2050, it is essential to find sustainable and nutritious food sources and new ingredients.

A comprehensive literature review was carried out to identify the latest fungi applications in the food industry, with an emphasis on the use of various waste products for the production of fungus-based foods. They conducted a specific study with the fungus *Monascus purpureus* aimed at producing red pigment as a substitute for synthetic dyes. This study evaluated different carbon sources such as mannitol, glucose, and sucrose, and constant pH conditions, alternating phases in the liquid cultivation of this fungus for the production of red pigment from *Monascus sp.*

The results indicated that mannitol, used as the sole carbon source, more effectively stimulated the extracellular red pigment production, achieving significant concentrations in less time, both in flask culture and bioreactors. Pigment production reached 25 AU in 60 hours of bioreactor cultivation under static pH conditions at 7.0, using mannitol as the sole carbon source. This demonstrates the great potential of mannitol as a carbon source to optimize the red pigment production.

**Keywords: Productivity, Fermentation, Natural Pigments, Carbon Sources, Influence of pH, Food Biotechnology**

# 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia de alimentos aplicada na melhoria de ingredientes e/ou na obtenção de novos produtos como alternativa saudável e sustentável é cada vez mais discutida. A utilização de microrganismo para melhorar alimentos é uma área de crescente interesse na indústria alimentícia pela sua capacidade de promover inovações sustentáveis, saudáveis e tecnológicas. O motivo para esse crescimento é a alta demanda global por produtos mais saudáveis, como, por exemplo, a demanda por pigmentos produzidos de forma natural em substituição aos sintéticos foi de US\$ 2,0 bilhões em 2021, com projeção de atingir US\$ 2,8 bilhões em 2028. Essa tendência está alinhada com a crescente conscientização dos consumidores sobre os benefícios dos alimentos saudáveis e sustentáveis, como mostrado em um estudo que indica que 75% dos consumidores estão dispostos a pagar mais por produtos que consideram saudáveis e naturais (Market Watch, 2022).

Para atender à crescente demanda por produtos saudáveis e sustentáveis, diversas tecnologias das ciências biológicas estão sendo integradas para desenvolver modelos mais precisos na produção de moléculas de interesse industrial. A fermentação de precisão é um exemplo notável dessa abordagem, destacando-se como uma solução eficaz para os desafios na produção de alimentos, sustentabilidade e aceitação pelo consumidor. Essa técnica utiliza microrganismos geneticamente modificados como chassis biológicos, permitindo a produção em larga escala de uma ampla gama de moléculas, incluindo aditivos alimentares, saborizantes naturais e nutrientes essenciais.

Com os avanços em engenharia genética, como as tecnologias CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que é uma tecnologia de edição genética que permite alterar sequências específicas de DNA de forma precisa, possibilitando a inserção, remoção ou modificação de genes com alta precisão (Doudna & Charpentier, 2014). e a edição de genes, surgem novas oportunidades para o desenvolvimento de produtos inovadores. Essa evolução não só facilita a criação de ingredientes mais saudáveis, mas também contribui para a redução do impacto ambiental na produção de alimentos. À medida que essas inovações são aplicadas, novos produtos e ingredientes começam a aparecer com frequência nas prateleiras do comércio, refletindo uma tendência crescente em direção a uma alimentação mais saudável e sustentável (Mason & Mazzocchi, 2019; Kovacs & Keresztes, 2022).

Entre os processos biotecnológicos de interesse, destacam-se a fermentação tradicional, que utiliza microrganismos nativos para enriquecer compostos nutricionais, e a fermentação de precisão. A fermentação tradicional, que visa a melhorar características como perfil de sabor, propriedades nutricionais e reologia, tem sido aplicada há bastante tempo. O enriquecimento das características dos alimentos durante a fermentação resulta de uma complexa série de processos bioquímicos, em que as culturas de microrganismos produzem enzimas e outros metabólitos. Esses componentes desempenham papel indispensável na decomposição de nutrientes complexos em compostos mais simples, conferindo, assim, características desejáveis aos alimentos. Além disso, a fermentação pode melhorar a qualidade nutricional dos produtos, por exemplo, elevando a concentração de aminoácidos pela hidrólise de proteínas ou pela síntese microbiana de aminoácidos e proteínas.

Já a fermentação de precisão permite a produção de compostos mais específicos como proteínas, gorduras e outros componentes alimentares pela modificação genética de microrganismos, podendo ser vista como uma otimização do microrganismo/bioprocessos para potencializar a produção de moléculas de interesse.

Essa tecnologia tem potencial para transformar a produção de alimentos, tornando-a mais sustentável e eficiente. Em 2024, o mercado global de fermentação de precisão foi estimado em \$1,6 bilhões e espera-se que cresça significativamente nos próximos anos (Finkel, 2023). Esta técnica é particularmente útil na produção de substitutos da carne, que precisam se assemelhar não apenas ao valor nutricional, mas também ao sabor e à textura dos produtos de origem animal (Verni; Holt & Rizzello, 2024.)

Os fungos são uma alternativa viável e sustentável para a produção de alimentos, destacando-se pela sua composição nutricional superior e capacidade de biotransformação. Eles contêm de 25% a 50% de proteínas em peso seco, além de serem ricos em aminoácidos essenciais e compostos bioativos, que são benéficos à saúde humana, incluindo beta-glucanas e polifenóis. A rápida taxa de crescimento e a versatilidade dos fungos em diversos substratos os tornam ideais para a produção em larga escala, facilitando a conversão de resíduos agrícolas em fontes nutritivas. Comparados a outras fontes de proteína, os fungos têm digestibilidade superior, evidenciada por suas menores taxas de indigestão e pela capacidade de regular lipídios e colesterol no organismo. Adicionalmente, a fermentação fúngica pode melhorar a textura e o sabor de produtos alimentares, tornando-os mais atraentes para os consumidores.

Em suma, as inovações na biotransformação de alimentos utilizando fungos têm o potencial de redefinir a indústria alimentícia, promovendo práticas mais sustentáveis e alinhadas com as expectativas dos consumidores modernos.

Diante deste contexto, a presente dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo trata de uma revisão de literatura sobre a utilização de fungos para produção de ingredientes e alimentos inovadores, em que é discutido o papel da fermentação de precisão e das novas tecnologias para produção de novos produtos, incluindo a utilização de subprodutos para produção de proteínas de célula única e biomassa celular proteica. O segundo capítulo apresenta um estudo experimental aplicando o fungo *Monascus purpureus* para produção de pigmento vermelho, visando ao aumento de produtividade desse pigmento, que pode ser aplicado em uma gama muito grande de produtos, em substituição ao corante vermelho sintético.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Demonstrar as inovações tecnológicas na biotransformação de ingredientes alimentícios utilizando fungos, com foco na utilização de resíduos agroindustriais, para a produção de proteínas, enzimas e pigmentos naturais. Avaliar o impacto de diferentes condições de cultivo na produção de pigmento vermelho de *Monascus purpureus*, com a utilização de diferentes fontes de carbono e o controle preciso de parâmetros como pH e oxigênio dissolvido em fermentação líquida em biorreator.

### 2.2 Específicos

- Realizar uma revisão da literatura sobre a utilização de fungos na produção de ingredientes e alimentos, destacando a produção de micoproteínas e a fermentação de precisão;
- Maximizar a produção de pigmento vermelho pelo fungo *Monascus purpureus* por meio de bioprocessos, utilizando meios de cultivo líquido contendo como única fonte de carbono manitol, glicose e sacarose;
- Comparar a eficiência da produção de pigmento vermelho utilizando diferentes meios como única fonte de carbono, incluindo sacarose, glicose e manitol;
- Avaliar o impacto da mudança de pH durante o cultivo (de 5,5 para 8,5) em comparação com a manutenção de pH constante igual a 7,0, visando ao aumento da produtividade de pigmento vermelho;
- Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento celular e a produtividade do pigmento extracelular produzido pelo *Monascus purpureus*; e.
- Avaliar a produção de pigmento vermelho por *Monascus purpureus* em biorreator de bancada, considerando variáveis de processo críticas.

### 3. CAPÍTULO I – ALIMENTOS À BASE DE FUNGOS

#### **Explorando o Potencial dos Fungos na Alimentação do Futuro: Uma visão sobre as Micoproteínas**

Lima, Alan Gomes <sup>1</sup>; Egea, Mariana Buranelo <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano (IF GOIANO), Campus Rio Verde, Rio Verde, GO

#### **Resumo**

A população mundial está em crescimento e, até 2050, espera-se que atinja nove bilhões de habitantes, o que gera um enorme desafio na procura por fontes alimentícias sustentáveis e saudáveis. Nesse contexto, os fungos parecem ser uma estratégia interessante, pois são capazes de converter de forma sustentável os subprodutos alimentares em alimentos e ingredientes ricos em nutrientes. A fermentação utilizando fungos permite transformar proteínas vegetais em alimentos populares. Outra abordagem na utilização de fungos para produção de alimentos é a fermentação de precisão, que permite um controle rigoroso das condições de fermentação para obter compostos específicos como proteínas, lipídios e carboidratos. Por fim, a terceira tecnologia que pode ser utilizada é a “*single cell protein*”, que consiste na obtenção de proteínas através de organismos, incluindo algas, bactérias, fungos e leveduras. Esses microrganismos são cultivados e processados para produzir biomassa rica em proteínas, que pode ser utilizada como suplemento alimentar para seres humanos e animais. Independentemente do método utilizado, a regulamentação é um aspecto sensível, especialmente pelas preocupações quanto à aceitação pública no que diz respeito à higiene e à segurança alimentar. Isso ocorre porque os fungos, muitas vezes associados a bolores, podem gerar desconfiança entre os consumidores. Além disso, quando cepas de fungos pertencem à mesma família de espécies patogênicas, ou quando resíduos e subprodutos são empregados na produção, surgem questionamentos adicionais sobre os riscos à saúde, tornando a regulamentação e o controle de qualidade fatores indispensáveis para garantir a segurança desses processos.

**Palavras-chave:** Fermentação de precisão, alimentos à base de fungos, novos alimentos.

### 3.1 Introdução

Há um crescente interesse global na substituição de produtos de origem animal por alternativas proteicas de fontes não animais, como vegetais, microbianas e insetos. Isso está sendo impulsionado pela população por suas diversas preocupações, que incluem questões ambientais, de saúde e éticas. Além disso, há um debate abrangente sobre a capacidade de o sistema alimentar atual fornecer proteínas de origem animal de forma sustentável para atender à população mundial em crescimento (Xiao et al., 2023).

A população mundial chegará a mais de nove bilhões de habitantes até 2050, o que aumentará a demanda por alimentos em cerca de 60%, conforme projeção da FAO (2018). Isso faz com que a busca por novas fontes de alimentos saudáveis e sustentáveis se torne cada vez mais urgente. Uma abordagem importante para essa substituição é o desenvolvimento de alimentos de origem não animal que possam reproduzir com precisão a qualidade e os atributos funcionais dos alimentos de origem animal. Essa estratégia tem por objetivo atender às preferências da maioria dos consumidores onívoros, ou seja, cerca de 90% da população (Broad et al., 2022). Neste sentido, emergem materiais como vegetais (*plant-based*) à base de insetos e fermentados microbianos. Recentes avanços em alimentos à base de plantas (*plant-based*) têm mostrado inovações significativas. Leguminosas como soja e ervilha são amplamente usadas em análogos de carne em razão do seu alto teor proteico e da capacidade de imitar a textura. Amêndoas e castanhas de caju são comuns em alternativas a derivados lácteos, como leites e queijos. Outros exemplos incluem o uso de grão-de-bico e lentilhas em substitutos de carne, e aveia e coco em produtos lácteos, como o popular leite de aveia (Finnigan; Mach & Edlin, 2023).

A utilização de insetos como alternativa alimentar vem ganhando espaço, com aplicações diversificadas, especialmente em produtos de panificação e à base de cereais, como biscoitos, pães, tortilhas e massas. Além do uso de pó de barata (*Nauphoeta cinerea*) torrada (variando de 5% a 15%) como enriquecimento proteico da farinha de trigo para a formulação de pão (García, Igual & Martínez, 2020), outras espécies também têm sido exploradas. Por exemplo, a farinha de grilo (*Acheta domesticus*) tem sido usada para aumentar o teor proteico de pães e massas, resultando em produtos com valor nutricional elevado e propriedades sensoriais bem aceitas (Kim et al., 2019). Larvas de *Tenebrio molitor* também são frequentemente incorporadas a biscoitos e barras de cereais, oferecendo uma alternativa rica em proteínas e ácidos graxos essenciais (Purschke et al., 2018).

Além dessas alternativas, a utilização de fungos tem recebido atenção como uma solução para a produção sustentável de alimentos. Uma abordagem consiste na conversão de subprodutos alimentares em alimentos comestíveis e nutritivos. Os fungos são capazes de transformar esses resíduos, aproveitando substratos ricos em carboidratos e nitrogênio. Outra abordagem é o cultivo de micélios comestíveis, que também se beneficiam do uso desses substratos (Wang et al., 2023).

Alguns exemplos são o fungo *Aspergillus oryzae*, amplamente utilizado para fermentação de diferentes recursos naturais, como arroz, arroz integral e farelo de arroz, e os fungos do gênero *Rhizopus* na fermentação da soja para produzir *tempeh*, um alimento indonésio tradicionalmente conhecido pela sua rica qualidade proteica. Estudos indicam uma variedade de potenciais benefícios à saúde associados ao consumo de alimentos fermentados, incluindo propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, hepatoprotetoras e anticancerígenas, que são associadas não somente ao substrato, mas também ao processo fermentativo (Sriherwanto, 2021).

Outra estratégia na utilização de fungos é a fermentação de precisão, em que os microrganismos são modificados geneticamente para potencializar a produção de moléculas de interesse comercial. Com o auxílio de múltiplas tecnologias de edição genética, como, por exemplo, recombinação de DNA, RNAi e CRISPR-Cas, as estratégias de engenharia do genoma introduzem deleção, inserção e/ou mutações pontuais em todo o genoma por meio de uma forma rastreável para acelerar a evolução da cepa (Si et al., 2015).

Outra estratégia é a *single cell protein*, que consiste na obtenção de proteínas pelo cultivo de microrganismos, preferencialmente aqueles que contêm mais de 30% de proteína em sua biomassa e que podem fornecer um equilíbrio saudável de aminoácidos essenciais. Essas proteínas podem ser utilizadas diretamente como alimentos ou para melhorar o conteúdo de proteínas ou a qualidade de alimentos fermentados. Um exemplo comercial é a produção da proteína fúngica ou micoproteína, comercializada pela Marlow Foods (Reino Unido) sob a marca '*Quorn*', que tem sido amplamente aceita como alternativa à carne (Wiebe, 2004). A cepa utilizada para obtenção deste produto é o *Fusarium venenatum* ATCC 2684, que é produzida sob um sistema de fermentação contínua, utilizando carboidrato como substrato, sendo sua biomassa reduzida em RNA, que constitui o micélio do fungo, e para atingir os critérios de segurança exigidos, o conteúdo de RNA da biomassa fúngica é minimizado. O caldo de cultura é exposto a um breve tratamento térmico, após ser colhido do fermentador para diminuir sua concentração de RNA de 10 para menos de 2% (matéria seca) (Saeed, 2023).

Apesar do crescimento e do aparecimento cada vez maior de novos produtos à base de fungos nas prateleiras nos centros comerciais, há uma barreira para adoção em larga escala dos fungos em substituição à proteína animal, sua percepção e aceitação pelos consumidores. Nesse sentido, em um estudo recente desenvolvido por Dean et al. (2023), os autores sugerem que a aceitação dos consumidores a estes alimentos está ligada à percepção de sustentabilidade, tendo em vista que estão cada vez mais conscientes dos impactos ambientais e motivados a adotar dietas com redução ou sem carne. A aceitação dos consumidores também está ligada à adequação cultural e culinária dos produtos cárneos alternativos. No entanto, a neofobia alimentar e a tecnológica são barreiras significativas para estes produtos. Consumidores mostram resistência a experimentar, comprar e pagar mais por novos produtos em razão das incertezas em relação aos métodos de produção e às percepções de impureza.

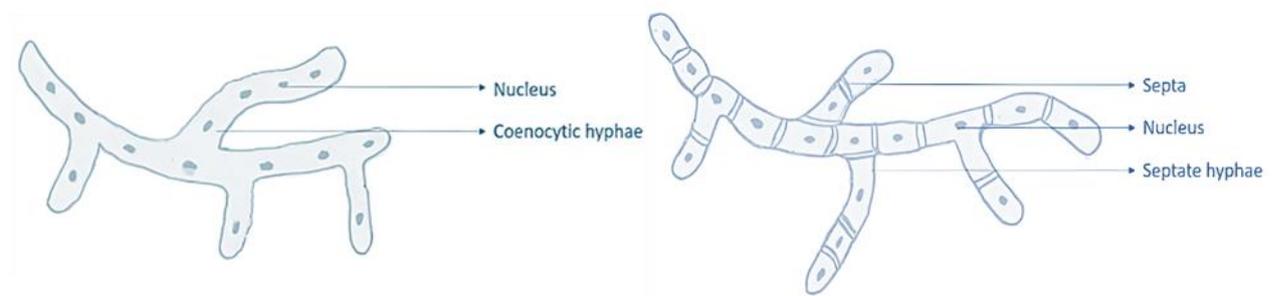
Diante deste cenário, este artigo busca oferecer uma visão abrangente das pesquisas científicas desenvolvidas mais recentemente para a produção de ingredientes e alimentos alternativos à base de fungos. Destacamos os avanços recentes e discutimos as perspectivas futuras, visando a contribuir para o avanço contínuo da indústria de proteínas alternativas.

### **3.2 Fungos Filamentosos**

O reino dos fungos é composto por uma variedade de organismos, como leveduras, bolores e cogumelos. Eles são diferentes do reino das plantas, animais e bactérias porque suas células têm as paredes feitas de quitina e glucanos, ao contrário das células vegetais, que têm celulose. Essas características fazem com que eles sejam agrupados em um grupo chamado Eumycota, que é diferente dos grupos Myxomycetes e Oomycetes, que são estruturalmente similares (Miguel; Naranjo & Toni, 2019).

Os fungos estão amplamente distribuídos pelo mundo, podendo ser encontrados no solo, na matéria orgânica em decomposição, como simbiontes e parasitas de plantas, animais e outros fungos. Eles desempenham papéis indispensáveis na decomposição da matéria orgânica e nos ciclos de nutrientes. Além disso, eles têm sido historicamente utilizados como fonte de alimento, como agentes levedantes na produção de pão e na fermentação de alimentos como vinho, cerveja e molho de soja. Desde a década de 1940, os fungos também são utilizados na produção de antibióticos (Zhgun, 2023) e, mais recentemente, várias enzimas produzidas por eles são utilizadas na indústria e em detergentes. Além disso, eles são usados como agentes biológicos no controle de ervas daninhas e pragas agrícolas (Shah, 2003.).

Em termos de morfologia, a maioria dos fungos se desenvolve como hifas, que são estruturas filamentosas em forma de cilindro. Essas hifas podem ser divididas em compartimentos por septos, ou podem ser multinucleadas e não compartimentadas (Figura 1). Algumas espécies de fungos desenvolveram estruturas especializadas para absorver nutrientes de hospedeiros vivos, como os haustórios em fungos parasitas de plantas e os arbúsculos em fungos micorrízicos (Madigan et al., 2016).



**Figura 1** - Estruturas morfológicas dos fungos

Fonte: Madigan et al. (2016)

### **3.3 Tipos de processos utilizados na fabricação de produtos fungi-based**

#### **3.3.1 Processo fermentativo como ferramenta para produção de ingredientes fungi-based**

Existem três principais métodos de desenvolver um processo de fermentação: fermentação em meio sólido ou SSF, fermentação na superfície de um líquido ou LSSF e fermentação submersa. Cada um desses métodos permite a produção de biomassa microbiana e de proteínas (Schmidell et al., 2001).

Na fermentação em meio sólido, os microrganismos são cultivados em um substrato sólido, como grãos ou cascas de cereais. Esses microrganismos se desenvolvem na superfície do substrato, formando uma camada de biomassa. O resultado é a produção de uma biomassa rica em microrganismos que, normalmente, aumentam o conteúdo de proteínas (Che, 2013). Este tipo de fermentação é comumente utilizado quando se trata de fungos, principalmente pela sua capacidade de penetrar no espaço substrato sólido e colonizar toda a matéria orgânica.

Na fermentação na superfície de um meio líquido, os microrganismos são cultivados na superfície de um líquido, como um caldo nutritivo. Nesse método, os microrganismos se multiplicam e formam uma camada de biomassa na superfície líquida. Essa camada de biomassa também é rica em microrganismos e proteínas, esse tipo de fermentação apesar de não ser muito comum pode ser aplicado para produção de materiais semelhantes a couro a

partir de micélio. Empresas como Ecovative, Mycoworks e Mycotech patentearam várias variações desse método (Bentangan et al., 2020, Kaplan-Bie et al., 2022).

Na fermentação submersa, os microrganismos são cultivados em um meio líquido, no qual estão completamente submersos. Nesse método, os microrganismos se multiplicam e se dispersam por todo o líquido, formando uma solução rica em biomassa e proteínas (Schmidell et al., 2001).

Cada método de cultivo apresenta suas vantagens e desvantagens, estando sua escolha relacionada principalmente com as características dos substratos utilizados para o cultivo e as características e bioprocessos relacionados ao microrganismo de interesse. Recentemente, vários estudos têm explorado a utilização de resíduos agroalimentares na fermentação fúngica, destacando os resultados promissores na produção de compostos bioativos e na valorização de subprodutos agrícolas, especialmente com fermentação em estado sólido e submersa. A Tabela 1 apresenta um resumo de pesquisas recentes, últimos quatro anos, em que foram utilizados resíduos agroalimentares para fermentação com fungos. Observa-se uma grande versatilidade dos fungos para produção dos mais diversos produtos, destacando-se, no caso, a utilização de subprodutos agroalimentares para a fermentação em estado sólido.

Tabela 1 - Prospecção de trabalhos científicos que utilizaram fermentação fúngica como modificação de substratos para produção de ingredientes

Substrato	Fermentação	Microrganismo	Características do produto	Referências
<i>Anacardium othonianum</i> Rizz	Estado sólido	<i>Rhizopus oligosporus</i>	O produto fermentado seco a 70°C se mostrou um ingrediente rico em proteína (14,99 g/100g), apresentando atividade antioxidante e baixo teor lipídico (1,95g/100g).	De Lima et al. (2021).
Bagaço de maçã	Estado sólido	<i>Zygomycetes</i>	A Fermentação com <i>U. isabellina</i> produziu um teor de GLA 12,72% maior em comparação com <i>A. elegans</i> (3,85 g GLA/kg DW de bagaço). <i>A. elegans</i> exibiu maior produtividade de carotenoides ( $\beta$ -caroteno, luteína e zeaxantina)	Dulf; Vodnar & Dulf (2023).
Farelo de trigo, casca de arroz e borra de café usada	Estado sólido	<i>Cryphonectria parasitica</i>	A fermentação produziu um complexo de proteínas em substratos de farelo de trigo, tendo sido a atividade da protease aspártica obtida, com valores acima de 2.000 UA/g. A atividade enzimática máxima foi detectada, com valores de 3.980,6UA/g <sup>sf</sup> , 4.123,5 UA/g <sup>sf</sup> e 3.703,2 UA/g <sup>sf</sup> , nos diferentes substratos testados. A atividade da protease foi de 133,6 UA/g <sup>sf</sup> .	Savino et al. (2021).
Bagaço de Mandioca	Estado sólido	<i>Bacillus</i> sp	Alta produção de amilase, atingindo o máximo de 437,76 U/g (equivalente a 87,55 U/mL de extrato enzimático bruto)	Não Gois & Silva (2020).

Farelo de cereais, sabugo de milho	Estado sólido	<i>Monascus purpureus, M. pilosus, M. ruber</i>	Produção de pigmentos naturais (vermelho, laranja e amarelo) e compostos bioativos, incluindo monacolíinas, que podem ajudar a reduzir os níveis de colesterol.	Não	Srianta et al. (2021).
Subprodutos lácteos	Estado sólido e Fermentação submersa	<i>Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus spp</i>	Produção de enzimas que auxiliam na digestão de proteínas, decomposição de peróxidos e quebra de lactose. Essas enzimas são aplicáveis na produção de alimentos funcionais e laticínios para melhorar a digestibilidade, reduzir intolerância à lactose e aumentar a segurança alimentar.;	Não	Shahrajabian, M.H. & Lin, M. (2022).

---

### **3.4 Fermentação de precisão e seu potencial para produção de insumos e ingredientes fungi based**

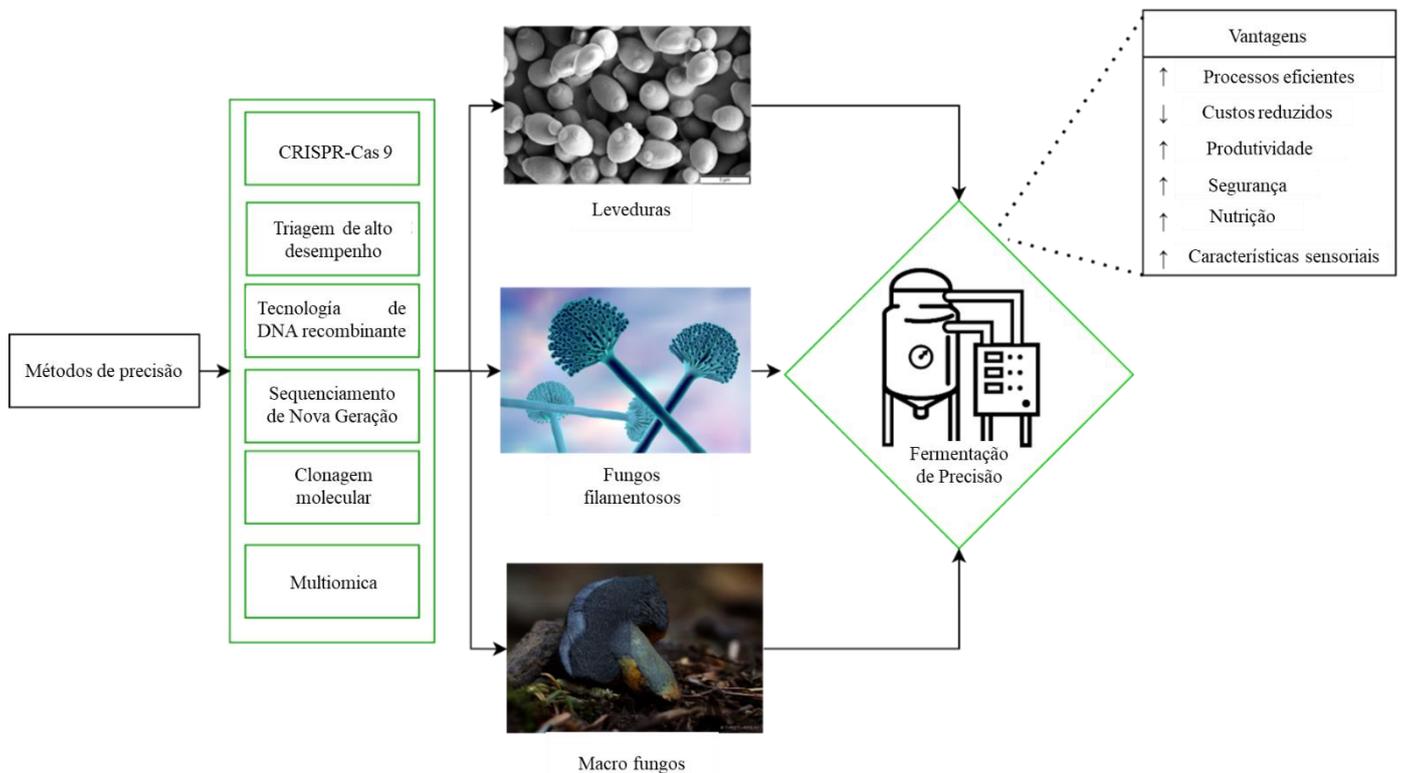
Nos últimos anos, vem sendo utilizado com muita frequência o termo "fermentação de precisão" para descrever processos fermentativos otimizados que envolvem o uso de microrganismos geneticamente modificados, OGMs, para atuarem como "indústrias celulares" e produzirem ingredientes alimentares funcionais de alto valor, como enzimas, lipídios, carboidratos, vitaminas, aromatizantes, corantes, antioxidantes e conservantes, com alta pureza e rendimento (Mazumdar; Pichler, 2020). Esses ingredientes normalmente seriam produzidos de forma insustentável através de agricultura, pecuária, extração em larga escala ou síntese orgânica. Entretanto, a fermentação de precisão oferece uma alternativa viável que está ligada à engenharia metabólica (Teng et al., 2021), que envolve a manipulação genética de microrganismos para produzir produtos que eles naturalmente não produzem (Boukid, 2023).

A engenharia metabólica utiliza uma série de abordagens e técnicas, incluindo bioinformática, sequenciamento de última geração, triagem de bibliotecas combinatórias, biologia sintética, engenharia enzimática, clonagem molecular, análise comparativa multiômica, modelagem cinética e aprendizado de máquina. Essas ferramentas ajudam a otimizar cepas microbianas, suas vias metabólicas específicas, rendimentos de produtos e escalonamento dos bioprocessos (*upstream*) e recuperação dos produtos (*downstream*), permitindo a produção em larga escala de ingredientes valiosos (Shi et al., 2022).

A ascensão da fermentação de precisão como uma tendência alimentar veio com a chamada na quarta revolução da indústria alimentícia (Hassoun et al., 2022), fenômeno que vem ganhando força nos últimos anos. Os avanços na biologia de precisão têm permitido a programação de microrganismos para a produção de moléculas orgânicas complexas (Tubb & Seba, 2019), o que tem aberto novas possibilidades para a indústria alimentícia.

A Figura 2 mostra como as tecnologias atuais de biologia molecular e bioinformática podem trazer vantagens aos processos de fermentação de precisão. A princípio, uma gama de métodos de engenharia genética e metabólicos pode ser aplicada como CRISPR-Cas, Clonagem molecular, técnicas multiômicas, podendo, com auxílio de bancos genômicos, buscar e obter sequências de interesse, que podem ser incorporadas aos microrganismos que servirão de chassi biológico, podendo ser leveduras, fungos filamentosos, bactérias, entre outros. Essas cepas, potencializadas, passarão por um processo de fermentação, agora de precisão, cujo objetivo é maximizar a produção do produto de interesse. A adoção dessa

metodologia garante algumas vantagens como um processo mais eficiente, apresentando altos rendimentos, impactando na redução do custo de produção, na obtenção de produtos com valores nutritivos maiores, maiores níveis de segurança, considerando que os genes que produzem moléculas potencialmente tóxicas podem ser inibidos, e, por fim, produtos com perfis sensoriais.



**Figura 2** - Esquema da aplicação de métodos de precisão na fermentação de fungos

Fonte: Adaptado de Chai, Kong F. et al. (2022)

Contudo, a comercialização da tecnologia de microrganismos OGMs para alimentos enfrenta vários desafios em razão de preocupações públicas sobre segurança, rotulagem e regulamentação (Burke, 2012). Isso levou a buscar estratégias alternativas para desenvolver microrganismos não OGM mais funcionais por meio de métodos convencionais (Pérez et al., 2015). A aplicação da fermentação de precisão na produção de proteínas, lipídios e carboidratos tem surgido como uma solução promissora para transformar os sistemas alimentares em escala global, com ênfase na sustentabilidade (Boukid, 2023).

Este método tem permitido a produção de proteínas de alta qualidade e valor nutricional. Isso pode ser particularmente valioso em mercados emergentes, onde a

disponibilidade de alimentos ricos em proteína pode ser limitada. Este método tem sido aplicado com sucesso na produção de lipídios de interesse para a indústria alimentícia, como ácidos graxos essenciais (AGEs) e fosfolípidos. Estes ingredientes têm potencial para serem incorporados em alimentos funcionais e produtos de bebida, aumentando sua demanda no mercado (Gómez et al., 2021).

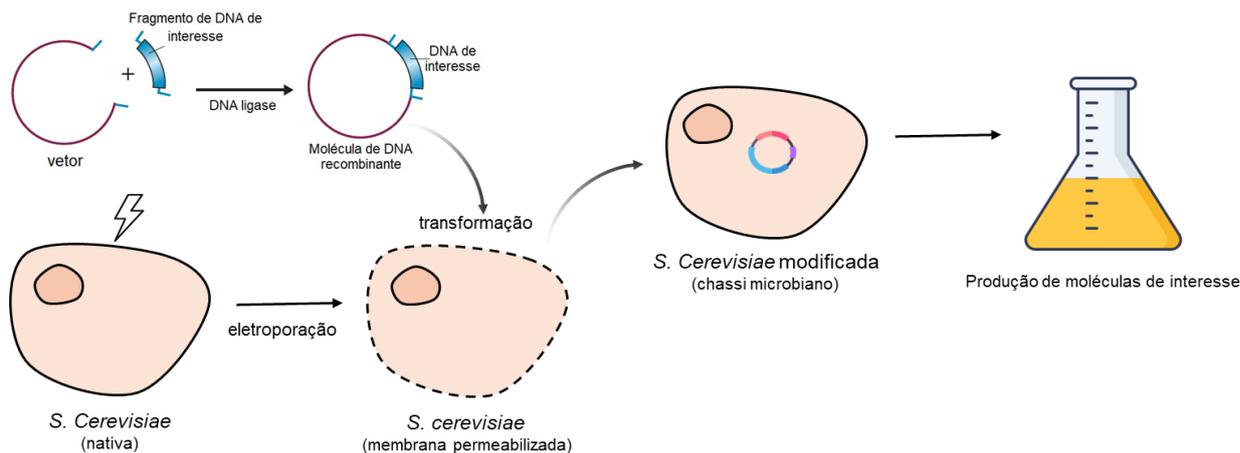
### **3.5 Fungos utilizados na fermentação de precisão**

#### **3.5.1 *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae*, historicamente associado à produção de pão, cerveja e vinho, é o modelo de hospedeiro microbiano eucariótico mais extensivamente caracterizado. Seu genoma foi completamente sequenciado e anotado, tendo modelos metabólicos abrangentes disponíveis. Além disso, sua tratabilidade genética e designação geralmente considerada segura (GRAS) consolidam sua posição como o chassi padrão-ouro para produção biotecnológica, rivalizando com a bactéria *Escherichia coli*.

Recentemente, a empresa de biotecnologia evolva teve sucesso comercializando diversos compostos, como vanilina (aromatizante), nootkatone e valenceno (ambos compostos aromáticos), L-arabinose (substituto do açúcar) e resveratrol (ingrediente funcional). Todos esses compostos foram produzidos utilizando cepas recombinantes de *S. cerevisiae* como chassi microbiano. A metodologia utilizada é baseada na incorporação do material genético de interesse a um vetor pela enzima DNA ligase, gerando moléculas de DNA recombinante (Figura 3). Posteriormente, essas moléculas são inseridas nos chassis microbianos em uma etapa chamada transformação, e as células transformadas são cultivadas para expressar as moléculas de interesse (Cohen et al., 1973).

Outras moléculas também foram produzidas por essa metodologia, como carotenoides, incluindo o licopeno, que são produzidos em escala industrial através de métodos de engenharia genética. Glicosídeos de esteviol, um substituto natural do açúcar, são comercializados como EverSweet™ pela Cargill (EUA), demonstrando ainda mais o potencial de *S. cerevisiae* na produção de compostos de alto valor agregado.



**Figura 3** - Esquema da aplicação da metodologia do DNA recombinante para geração de chassis microbiano e produção de moléculas de interesse.

Fonte: Cohen et al. (1973)

### 3.5.2 *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica*, anteriormente *Candida lipolytica*, é uma levedura oleaginosa amplamente distribuída na natureza, destacando-se por sua robusta tolerância a pH, solventes e sal. Emergindo como um modelo promissor de chassi de levedura, sua capacidade metabólica única para degradar substratos hidrofóbicos e lipofílicos, juntamente com sua habilidade de acumular até 40% de lipídios no peso de células secas, a posiciona como um chassi de excelência para a produção recombinante de produtos derivados de lipídios ou ácidos graxos (PARK et al., 2020). Historicamente, *Y. lipolytica* tem sido empregada na produção de ácido cítrico, proteína unicelular para alimentação animal e compostos de aroma alimentar  $\gamma$ -decalactona, através da biotransformação do substrato não natural ricinoleato (Madzak, 2018). Substitutos naturais do açúcar, como rebaudiosídeos A e M, são agora produzidos de forma recombinante por meio da engenharia genética de *Y. lipolytica* e comercializados pela DSM (Holanda), assim como ácidos graxos ômega-3, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA), promotores da saúde, sob a marca New Harvest™. A produção recombinante de licopeno também alcançou escala comercial (Niehus et al., 2018).

### 3.5.3 *Komagataella phaffii*

*Komagataella phaffii*, anteriormente *Pichia pastoris*, é outro modelo emergente de levedura oleaginosa (Vogl & Glieder, 2013), amplamente estudada pela sua capacidade metilotrófica única, diferenciando-se de *S. cerevisiae* e *Y. lipolytica*. Sua notável seletividade na secreção de proteínas extracelulares, preferencialmente proteínas recombinantes, posiciona *K. phaffii* como um chassi de levedura altamente eficiente, preferida para a produção de proteínas eucarióticas recombinantes. Este chassi tem sido empregado com sucesso na produção industrial de várias enzimas recombinantes (Bustos et al., 2022.)

Um avanço significativo na biotecnologia alimentar recente foi a produção de leghemoglobina de soja recombinante por *K. phaffii*, utilizada como aromatizante "semelhante ao sangue" em produtos comerciais de carne à base de plantas da Impossible Foods™ (McClements & Grossmann, 2021).

Além disso, a mioglobina bovina recombinante (Motif FoodWorks™) e o ovomucoide de galinha (The EVERY Company™), produzidos a partir de *K. phaffii*, receberam aprovação da Food and Drug Administration (FDA), para uso alimentar (Chen et al., 2020).

Atualmente, *K. phaffii* mostra-se promissor na produção de taumatina recombinante, um substituto proteico de açúcar de origem vegetal recentemente aprovado pela FDA EUA e pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), sendo 100.000 vezes mais doce que a sacarose numa base molar (Aguilar et al., 2011).

### 3.5.4 *Aspergillus spp.*

O gênero *Aspergillus* desempenha papel fundamental na biotecnologia industrial de fungos, com destaque para *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Essas espécies têm sido tradicionalmente utilizadas em diversas fermentações alimentares para a produção de vinagre, vinho, molhos e carne fermentada. Ambas têm status GRAS e são reconhecidas como produtores industriais bem estabelecidos de uma ampla gama de enzimas para o processamento de alimentos (Ntana et al., 2020). Em razão de suas excelentes capacidades metabólicas e produtivas, além de um perfil de segurança favorável e de um portfólio prolífico de produtos, *A. niger* pode ser considerado o modelo de chassi de molde biotecnológico.

O uso de espécies de *Aspergillus* em biotecnologia teve início há, aproximadamente, um século, quando James Currie, um químico alimentar, em 1917 descobriu que o fungo

filamentoso *A. niger* era capaz de produzir ácido cítrico, um aditivo alimentar e de bebidas, que era convencionalmente extraído de frutas cítricas. Desde então, a produção de ácido cítrico agora feita em culturas de *A. niger*, que crescem em meios mínimos baratos à base de açúcar, tornou-se um negócio multibilionário (Papagianni, 2007).

Além de ácido cítrico, este fungo é capaz de produzir uma gama muito grande de moléculas de interesse comercial. Empresas como AB Enzymes, BASF, Chr. Hansen, DuPont e Novozymes são apenas alguns exemplos de empresas que usaram ou ainda usam espécies de *Aspergillus* na fabricação em larga escala de produtos comerciais, como ácidos orgânicos, enzimas, proteínas e metabólitos secundários (Meyer et al., 2016).

### **3.5.5 *Trichoderma reesei***

*Trichoderma reesei* tem uma longa história de uso na indústria de biorrefinarias e biocombustíveis, graças à sua capacidade altamente eficiente de secreção de hemicelulase e celulase. Atualmente, *T. reesei* também é responsável pela produção industrial de diversas enzimas alimentares, como celulase, carboidrases, proteases, lipases e lisozima. Por meio de técnicas de evolução dirigida, *T. reesei* pode alcançar títulos extremamente elevados de proteínas secretadas, despertando um grande interesse na indústria de proteínas alternativas. (Luo et al., 2020).

Produtos notáveis incluem a  $\beta$ -lactoglobulina bovina recombinante, principal ingrediente do soro de leite livre de origem animal vendido pela Perfect Day™, e uma cepa recombinante produtora de ovalbumina, da startup finlandesa de tecnologia de alimentos Onego Bio, que está se preparando para sua comercialização como um produto proteico unicelular.

### **3.5.6 *Fusarium* spp.**

Estudos têm focado na utilização de *Fusarium solani* para a síntese de ésteres de sabor, otimizando o processo para produção de compostos desejáveis na indústria alimentícia. A pesquisa mostrou que *Fusarium solani* pode ser eficaz na biotransformação de substratos, produzindo compostos como ésteres que são utilizados como agentes flavorizantes em diversos produtos alimentícios (Barros et al., 2012).

Outro estudo explorou a capacidade de *Fusarium oxysporum* em processos de bio-oxidação para a indústria de sabores, destacando a produção de compostos como R-(+)- $\alpha$ -terpineol a partir da biotransformação de limoneno. Este processo é altamente valorizado na produção de aromas naturais, substituindo métodos químicos tradicionais, que podem ser menos sustentáveis (Bicas et al., 2008).

## **5.6 Uso de fermentação de precisão para a produção de ingredientes fungi-based**

A fermentação de precisão é uma abordagem avançada que permite um direcionamento da maquinaria celular ou seja do seu metabolismo, para otimizar a produção de compostos específicos, desempenhando papel importante na síntese de ingredientes de proteínas alternativas de alta qualidade. Além disso, técnicas modernas de isolamento e seleção de microrganismos têm permitido a identificação de cepas fúngicas com potencial para a produção de compostos de interesse para a indústria alimentícia (Augustin et al., 2023).

Avanços recentes no campo da biotecnologia têm possibilitado a modificação genética de fungos para aumentar a produção de compostos desejáveis e melhorar suas propriedades nutricionais e funcionais. Essa abordagem tem impulsionado ainda mais a utilização de fungos na produção de ingredientes fontes de proteínas alternativas, oferecendo novas oportunidades para a criação de alimentos sustentáveis e nutritivos.

Chezan et al. (2022) avaliaram os aspectos que influenciam no consumo de proteína fúngica, em substituição à carne animal, e mostraram que, embora a aceitação seja influenciada pela familiaridade, contexto da refeição e estigma do mofo, a sustentabilidade é uma preocupação. No entanto, a aceitação também é impactada diretamente pela experiência sensorial. O estudo indica necessidade de aumentar o apelo no mercado ao aprimorar o sabor das proteínas fúngicas.

Entre os produtos que estão sendo pesquisados ou já estão sendo comercializados com a fermentação de precisão, chama atenção a leghemoglobina (ou legHb) de soja, produzida pela levedura modificada *Pichia pastoris*, que confere aos hambúrgueres vegetais da *Impossible Foods* o sabor e a cor característicos da carne animal (Ismail; Hwang & Joo., 2020). Outra proteína heme derivada de levedura é a Hemami™ (Motif FoodWorks, Boston, MA, EUA), que melhora o sabor umami e o aroma de carne, potencialmente elevando a aceitação dos consumidores por produtos à base de plantas.

Além disso, a fermentação de precisão é utilizada para produzir gorduras com estruturas moleculares semelhantes às estruturas de gorduras animais. A Melt & Marble, por exemplo, desenvolveu uma alternativa à gordura bovina por meio de leveduras e fermentação de precisão (Teng et al., 2021). Em termos de vitaminas, a cofermentação de *Propionibacterium freudenreichii* e *Lactobacillus brevis* em farelo de trigo tem gerado quantidades significativas de vitamina B12, que pode ser usada para fortificar produtos cárneos vegetais, compensando sua ausência natural em fontes vegetais (Xie et al., 2019).

Enzimas derivadas de fermentação de precisão também podem atuar como pós-processadores, solucionando limitações funcionais das proteínas vegetais. Empresas estabelecidas no setor de enzimas podem usar sua expertise para criar um portfólio personalizado de enzimas, enfrentando os desafios das proteínas vegetais. Além disso, a biologia computacional "ômica" e a engenharia de processos ajudam a identificar e desenvolver novas variantes com funcionalidades aprimoradas.

A fermentação de precisão também está sendo utilizada para produção de proteínas do ovo, como a ovalbumina (OVA), utilizando como agente produtor o fungo *Trichoderma reesei* (Tr-OVA), que pode se tornar um substituto sustentável para a proteína em pó da clara do ovo de galinha - um ingrediente amplamente utilizado na indústria alimentícia (Järviö et al., 2021).

Em uma pesquisa que avaliou a aceitação do consumidor em relação a ovos produzidos por fermentação de precisão, os resultados indicam que os ovoprodutos fabricados com fermentação de precisão (PF) têm boas chances de encontrar um mercado receptivo. Uma proporção significativa (51-61%) de consumidores nos EUA, Alemanha e Singapura está, pelo menos, disposta a experimentar esses produtos (Zollman et al., 2023).

### **3.7 Fermentação de biomassa e potencial de produção de *single cell protein***

O termo "proteína de célula única" (SCP) é usado para descrever qualquer proteína obtida a partir de fontes microbianas, seja na forma de biomassa ou de proteína isolada. Essas proteínas são produzidas com o objetivo de serem usadas como suplementos alimentares ricos em proteínas, tanto para humanos quanto para animais, podendo ser de origem vegetal ou animal. Vários microrganismos são utilizados para a produção de proteínas unicelulares, incluindo bactérias (por exemplo, *Rhodobacter capsulatus*), leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Candida utilis*, *Torulopsis glabrata* e *Geotrichum*

*candidum*), algas (por exemplo, *Spirulina*, suplemento dietético, e *Chlorella*) e fungos (como *Aspergillus oryzae*, *Fusarium venenatum*, *Trichoderma* e *Rhizopus*) (Ritala, 2017).

SCP é composta por células secas de microrganismos ou proteína total extraída da biomassa, constituindo uma fonte barata e rica de proteína de alta qualidade (~50-80% em base seca). Além disso, contém carboidratos, vitaminas, minerais e outros elementos como fósforo e potássio (Malav et al., 2017).

Os SCPs oferecem várias vantagens em comparação com as proteínas tradicionais. Eles podem ser produzidos durante todo o ano, requerendo menos espaço e tempo. O teor total de proteínas e a composição dos SCPs variam conforme a fonte microbiana. Por exemplo, os SCPs derivados de fungos e leveduras têm um conteúdo proteico de 50-55%, com pequenas quantidades de metionina e cisteína (Saeed et al., 2016). Em contraste, os SCPs bacterianos contêm 60-80% de proteína, com um alto teor de metionina e lisina (Suman et al., 2015).

A Tabela 2 exibe os trabalhos publicados na literatura nos últimos cinco anos, apresentando produtos de células únicas. Observou-se na maioria dos trabalhos analisados que, para a produção de SCP, prevalece nesses trabalhos a utilização de fermentação submersa, em que, posteriormente, o caldo fermentado contendo proteínas pode ser utilizado para enriquecer diferentes produtos alimentícios. Todos os trabalhos analisados apresentaram uma porcentagem de proteínas acima de 30% no caldo final, além de outros macronutrientes. Apesar de muitos microrganismos serem utilizados, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem muitas aplicações para produção de SPC, devido ao fato de essa levedura ser utilizada como modelo para uma gama de aplicações biotecnológicas.

Tabela 2 - Prospecção de trabalhos científicos que utilizaram proteína de microrganismos de célula única para produção de ingredientes ou produtos alimentícios

Microrganismo	Tipo de Fermentação	Substrato	Análise aproximada do SCP	Aplicação do SCP	Principais Resultados	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentação submersa	subprodutos de frutas e vegetais (casca de banana, casca de frutas cítricas, casca de batata e bagaço de cenoura)	Umidade, proteína, fibra, carboidratos	Pão enriquecido com diferentes concentrações de SCP (0, 4, 8 e 12%)	<p>Maior rendimento de SCP foi obtido na temperatura de incubação de 30 °. A casca de batata apresentou o máximo rendimento de SCP e a casca de citrinos produziu o menor teor de SCP. A adição de sulfato de amônio e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio aumentou significativamente o rendimento, independentemente do tipo de desperdício alimentar. O SCP produzido foi considerado rico em aminoácidos, especialmente em aminoácidos essenciais (EAAs), em comparação com a farinha de trigo.</p>	Khan et al. (2022).
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 36858	Fermentação submersa	subprodutos de peixes, representados por cabeça, vísceras, pele e espinhas, cascas de abacaxi, banana, maçã e frutas cítricas	Proteína bruta, umidade, cinzas e lignina, gordura bruta e ácidos graxos	Ração animal	<p>A utilização conjunta de resíduos alimentares de origem animal e vegetal apresentou ao final da fermentação 40,19% de proteína, 4,46% de lipídio bruto, 1,08% de cinzas e 6,29% de lignina. Houve redução nos açúcares solúveis e insolúveis de 20,5% para 6,10% e de 19,15% para 2,14%, respectivamente, no final do processo.</p>	Tropea et al. (2022).
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fermentação submersa em dois estágios	subprodutos alimentares retirados da alimentação reator de anaeróbica foram da do digestão	Proteína bruta, proteína carboidratos	DQO, solúvel, -	<p><i>Yarrowia lipolytica</i> pode converter eficientemente resíduos alimentares em SCP, obtendo ao final do processo valores de teor de proteína de 38,8 p/p de biomassa seca; taxa de remoção de DQO foi de 85,5%, expressões reguladas positivamente de ATP citrato (pro-S) -liase e fumarato hidratase, classe II, o que resultou na síntese eficiente de SCP. .</p>	Yang et al. (2022).
<i>Lactobacillus sp</i>	Fermentação submersa	cascas de laranja, cascas de cebola e fibra	Proteínas totais, cinzas.	gordura, Ingrediente funcional	<p>O SCP foi considerado rico em macronutrientes em vitais, como proteínas 48,34 %, gordura 2,44%,</p>	Kaur (2022).

Microrganismo	Tipo de Fermentação	Substrato	Análise aproximada do SCP	Aplicação do SCP	Principais Resultados	Referência
		vagens de ervilha	funcionais: densidade aparente, absorção de água, óleo. Capacidades: Formação de espuma, emulsão, inibição de DPPH e fenóis totais.	produtos alimentícios.	fibra 2,97% e cinzas 5,93 %. As propriedades funcionais do SCP foram: densidade aparente 0,62 g/cm <sup>3</sup> , absorção de água 2,31 mL/g e óleo 1,89 mL/g.; e capacidade de formação de espuma 12,25%, emulsão 50,5%, inibição de DPPH 38,84% e fenóis totais 10,19 mg GAE/g)].	
<i>Cyberlindnera jadinii</i> , <i>Wickerhamomyces anomalus</i> , <i>Blastobotrys adenivorans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentação e submersa	madeira de abeto despolpada com sulfito enzimaticamente sacarificada hidrolisados de subprodutos de frango	Proteínas totais, gordura, e fibra, cinzas.	Alimentos	Ao final do processo, houve uma produção de 0,4–0,5 g de peso seco celular e 0,2–0,3 g de proteína por g de açúcar. <i>B. adenivorans</i> destacou-se como a levedura Lapeña, et mais versátil em termos de consumo de al. (2020). nutrientes e, neste caso, os rendimentos chegaram a 0,9 g de células e a 0,5 g de proteína por g de açúcar.	

### 3.8 Perspectivas futuras

A fermentação utilizando substratos como subprodutos agroindustriais tem se mostrado uma solução verde e sustentável para benefício do meio ambiente e para a disponibilidade de alimentos. A utilização principalmente de plantas tem gerado alimentos com grandes valores nutricionais por apresentar uma grande versatilidade tanto de substratos, como de microrganismos. Esses resíduos fornecem ingredientes/biomassa/produtos minimamente processados com propriedades sensoriais aprimoradas e benefícios à saúde. Mais pesquisas são necessárias para selecionar o iniciador adequado para fermentar materiais à base de resíduos, a fim de oferecer produtos nutricionalmente balanceados com sabor e aroma desejáveis.

A fermentação de precisão poderia fornecer compostos específicos que poderiam melhorar a qualidade dos alimentos para corresponder à mesma qualidade dos produtos de origem animal. No entanto, seus principais desafios incluem a percepção do consumidor sobre produtos geneticamente modificados, escalabilidade e preocupações éticas e regulamentares. Ainda falta a compreensão dos consumidores sobre a fermentação de precisão, sendo, portanto, necessária uma maior sensibilização para as tecnologias alimentares inovadoras. No futuro, serão necessários estudos sensoriais qualitativos e quantitativos para uma melhor compreensão da aceitação/rejeição do consumidor à fermentação de precisão. A digestibilidade de produtos à base de fungos e seus efeitos na composição da microbiota intestinal são pouco investigados. Esses estudos são de grande relevância para a compreensão do impacto desses alimentos para saúde humana. No entanto, com o avanço das pesquisas e a disponibilidade de novos produtos no mercado, a fermentação de precisão poderá fornecer alimentos de qualidade nutricional para garantir a disponibilidade de alimentos no futuro.

Ademais, a produção de proteínas de célula única obtida através de microrganismos como leveduras oferece uma alternativa sustentável e eficiente para suplementar a dieta humana. Rica em nutrientes essenciais e de alta digestibilidade, contribui para a segurança alimentar global e para a redução da pegada ecológica da produção de alimentos.

### 3.9 Referências

- AGUILAR, F. et al. EFSA panel on food additives and nutrient sources added to food. Scientific opinion on the safety of glycerol esters of tall oil rosin for the proposed uses as a food additive. *EFSA J*, v. 9, n. 5, p. 2141, 2011.
- AUGUSTIN, Mary Ann et al. Innovation in precision fermentation for food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-21, 2023.
- BICAS, Juliano Lemos et al. Optimization of R- (+)- $\alpha$ -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1061-1070, 2008.
- BOUKID, Fatma et al. Bioengineered enzymes and precision fermentation in the food industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 10156, 2023.
- BUSTOS, Cristina et al. Advances in cell engineering of the *Komagataella phaffii* platform for recombinant protein production. **Metabolites**, v. 12, n. 4, p. 346, 2022.
- CHAI, Kong F. et al. Precision fermentation to advance fungal food fermentations. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, p. 100881, 2022.
- CHEZAN, Dana; FLANNERY, Orla; PATEL, Ajay. Factors affecting consumer attitudes to fungi-based protein: A pilot study. **Appetite**, v. 175, p. 106043, 2022.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). **Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240-3244."
- CURRIE, James N. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. **J Biol Chem**, v. 31, n. 1, p. 15-37, 1917.
- DE BARROS, Dragana PC et al. Optimization of flavor esters synthesis by *Fusarium solani* pisi cutinase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 275-284, 2012.
- DE LIMA, Thayanara Mayara et al. *Rhizopus oligosporus* as a biotransforming microorganism of *Anacardium othonianum* Rizz. byproduct for production of high-protein, -antioxidant, and-fiber ingredient. *LWT*, v. 135, p. 110030, 2021.
- DEAN, David et al. Should I really pay a premium for this? Consumer perspectives on cultured muscle, plant-based and fungal-based protein as meat alternatives. **Journal of International Food & Agribusiness Marketing**, p. 1-25, 2023.
- DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014.
- DULF, Francisc Vasile; VODNAR, Dan Cristian; DULF, Eva-Henrietta. Solid-state fermentation with Zygomycetes fungi as a tool for biofortification of apple pomace with  $\gamma$ -linolenic acid, carotenoid pigments and phenolic antioxidants. **Food Research International**, v. 173, p. 113448, 2023.

EVIDENTE, Antonio. Specialized metabolites produced by phytopatogen fungi to control weeds and parasite plants. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 843, 2023.

FAO. The future of food and agriculture: alternative pathways to 2050. Rome, 2018. Disponível em: <https://www.fao.org/3/I8429EN/i8429en.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2024.

FINNIGAN, T.; MACH, K.; EDLIN, A. Mycoprotein: a healthy new protein with a low environmental impact. In: **Sustainable protein sources**. Academic Press, 2024. p. 539-566.  
**Food Matters Live**. (2023). 5 plant-based food trends and innovations for 2023. Retrieved from <https://www.foodmatterslive.com/article/5-plant-based-food-trends-and-innovations-for-2023/>

GARCÍA-SEGOVIA, Purificación; IGUAL, Marta; MARTÍNEZ-MONZÓ, Javier. Physicochemical properties and consumer acceptance of bread enriched with alternative proteins. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 933, 2020.

Gómez, B., Munekata, P. E. S., Zhang, W., Pérez-Álvarez, J. A., & Lorenzo, J. M. (2021). "Antioxidant and antimicrobial effects of essential oils in meat and meat products: A review." *Food Research International*, 114, 412-423.

ISMAIL, Ishamri; HWANG, Young-Hwa; JOO, Seon-Tea. Meat analog as future food: A review. **Journal of animal science and technology**, v. 62, n. 2, p. 111, 2020.

JÄRVIÖ, Natasha et al. Ovalbumin production using *Trichoderma reesei* culture and low-carbon energy could mitigate the environmental impacts of chicken-egg-derived ovalbumin. **Nature food**, v. 2, n. 12, p. 1005-1013, 2021.

JIN, Yuan et al. Evaluating potential risks of food allergy and toxicity of soy leghemoglobin expressed in *Pichia pastoris*. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 1, p. 1700297, 2018.

KAUR, Narinder; CHAVAN, Aditya. Production of Single-Cell Protein from Fruit and Vegetable Waste Using an Isolated Strain of *Lactobacillus* spp. **Industrial Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 304-313, 2022.

KHAN, Muhammad Kashif Iqbal et al. Sustainable food industrial waste management through single cell protein production and characterization of protein enriched bread. **Food Bioscience**, v. 46, p. 101406, 2022.

KOVACS, Ildiko; KERESZTES, Eva Reka. Perceived consumer effectiveness and willingness to pay for credence product attributes of sustainable foods. **Sustainability**, v. 14, n. 7, p. 4338, 2022.

LAPEÑA, David et al. Production and characterization of yeasts grown on media composed of spruce-derived sugars and protein hydrolysates from chicken by-products. **Microbial cell factories**, v. 19, p. 1-14, 2020.

LUO, Yun et al. Modification of transcriptional factor ACE3 enhances protein production in *Trichoderma reesei* in the absence of cellulase gene inducer. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, p. 1-16, 2020.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

Madzak, C. (2018). "*Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering." **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102(2), 615-639.

- MALAV, Anamika et al. A critical review on single cell protein production using different substrates. **Int. J. Dev. Res**, v. 7, p. 16682-16687, 2017.
- MAZUMDAR, Sanjay; PICHLER, Daniel. 2020 state of the industry report. **Composites fabrication**, n. Jan 2020, 2020.
- MAZUMDAR, Sanjay; PICHLER, Daniel. 2020 state of the industry report. **Composites fabrication**, n. Jan 2020, 2020.
- MCCLEMENTS, David Julian; GROSSMANN, Lutz. The science of plant-based foods: Constructing next generation meat, fish, milk, and egg analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 20, n. 4, p. 4049-4100, 2021.
- MEYER, Vera et al. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal biology and biotechnology**, v. 3, p. 1-17, 2016.
- Miguel, A., Naranjo-Ortiz., Toni, Gabaldón. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, 94(6):2101-2137. doi: 10.1111/BRV.12550.
- NAIK, Bindu et al. Agroindustrial waste: a cost-effective and eco-friendly substrate to produce amylase. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 30, 2023.
- NIEHUS, Xochitl et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to enhance lipid production from lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 1-10, 2018.
- NTANA, Fani et al. Aspergillus: a powerful protein production platform. *Catalysts* 10: 1064. 2020.
- PAPAGIANNI, M. (2007). "Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling." **Biotechnology Advances**, 25(3), 244-263.
- PARK, Young-Kyoung; NICAUD, Jean-Marc. Metabolic engineering for unusual lipid production in *Yarrowia lipolytica*. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1937, 2020.
- RITALA, Anneli et al. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 300587, 2017.
- SAEED, Farhan et al. Role of mycoprotein as a non-meat protein in food security and sustainability: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 26, n. 1, p. 683-695, 2023.
- SAEED, Muhammad et al. Single cell proteins a novel value added food product. **Pakistan Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 4, p. 211-217, 2016.
- SAVINO, Salvatore et al. Agroindustrial wastes: a substrate for multi-enzymes production by *Cryphonectria parasitica*. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 279, 2021.
- SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotechnologia industrial-vol. 2: Engenharia Bioquímica**. Editora Blucher, 2001.
- SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 413-423, 2003.
- SHAHRAJABIAN, M.H., & Lin, M. (2022). "Research Progress of Fermented Functional Foods and Protein Factory-Microbial Fermentation Technology." *Fermentation*.

- SHI, Shuobo et al. Synthetic biology: a new frontier in food production. **Trends in Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 781-803, 2022.
- SI, Tong; XIAO, Han; ZHAO, Huimin. Rapid prototyping of microbial cell factories via genome-scale engineering. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1420-1432, 2015.
- SRIANTA, Ignatius et al. Utilization of agro-industrial by-products in *Monascus* fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, p. 1-12, 2021.
- SRIHERWANTO, Catur. Recent potential biotechnological applications of the tempeh mould *Rhizopus*. A short review. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2021. p. 012066.
- SUMAN, Gour et al. Single cell protein production: a review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 9, p. 251-262, 2015.
- TENG, Ting Shien et al. Fermentation for future food systems: Precision fermentation can complement the scope and applications of traditional fermentation. **EMBO reports**, v. 22, n. 5, p. e52680, 2021.
- TRINCI, A. P. J. Quorn mycoprotein. **Mycologist**, v. 5, n. 3, p. 106-109, 1991.
- TROPEA, A. et al. Single cell protein production through multi food-waste substrate fermentation. *Fermentation*. 2022; 8 (3): 91.
- VOGL, Thomas; GLIEDER, Anton. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385-404, 2013.
- WANG, Jian et al. Fungal solid-state fermentation of crops and their by-products to obtain protein resources: The next frontier of food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2023.
- WHITTAKER, Jack A. et al. The biotechnology of quorn mycoprotein: past, present and future challenges. **Grand challenges in fungal biotechnology**, p. 59-79, 2020.
- WIEBE, Marilyn G. Quorn™ Myco-protein-Overview of a successful fungal product. **Mycologist**, v. 18, n. 1, p. 17-20, 2004.
- XIAO, Xiao et al. Updates on Plant-Based Protein Products as an Alternative to Animal Protein: Technology, Properties, and their Health Benefits. **Molecules**, v. 28, n. 10, p. 4016, 2023.
- XIE, Chong et al. Co-fermentation of *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus brevis* in Wheat Bran for in situ Production of Vitamin B12. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1541, 2019.
- YANG, Rui et al. Two-stage fermentation enhanced single-cell protein production by *Yarrowia lipolytica* from food waste. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127677, 2022.
- ZHGUN, Alexander A. Industrial production of antibiotics in fungi: current state, deciphering the molecular basis of classical strain improvement and increasing the production of high-yielding strains by the addition of low-molecular weight inducers. **Fermentation**, v. 9, n. 12, p. 1027, 2023.

ZOLLMAN THOMAS, Oscar et al. Not getting laid: Consumer acceptance of precision fermentation made egg. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1209533, 2023.

#### 4. CAPÍTULO II – MEIOS À BASE DE MANITOL E PH ESTÁTICO SÃO CONDIÇÕES EFICIENTES PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTO VERMELHO DE *MONASCUS PURPUREUS* ATCC 36928 EM CULTIVO SUBMERSO

*Processes* 2023, 11(2), 633; <https://doi.org/10.3390/pr11020633>

Submission received: 27 December 2022 / Revised: 15 February 2023 / Accepted: 16 February 2023 / Published: 19 February 2023

(This article belongs to the Special Issue Advances in Industrial Biotechnology: Bioprocess and Bioseparation)

##### Resumo

Os fungos da espécie *Monascus* são utilizados na Ásia para a produção de alimentos fermentados, principalmente pela capacidade de esses fungos produzirem metabólitos secundários, como pigmentos. Devido à crescente discussão sobre o uso de corantes sintéticos e ao fato de sua ingestão estar associada a danos à saúde humana, estudos têm buscado a substituição desses corantes por pigmentos naturais, e novas alternativas para a produção desses pigmentos naturais têm sido apresentadas. Neste contexto, os pigmentos *Monascus* são uma alternativa viável para aplicação na indústria alimentícia. Este estudo teve como objetivo avaliar diferentes fontes principais de carbono e condições de pH na produção de pigmento vermelho de *Monascus* sp. Descobrimos que o manitol, quando utilizado como única fonte de carbono, estimulou a produção de pigmento vermelho extracelular, atingindo concentração de 8,36 UA em 48 h, enquanto glicose e sacarose atingiram concentrações de 1,08 e 1,34 UA, respectivamente. O cultivo em biorreator utilizando manitol apresentou grande potencial para otimizar a produção de pigmento e obter alta concentração de pigmento extracelular em curto espaço de tempo, atingindo concentração de 25 UA em 60 h de cultivo. A mudança no pH alterou a produção de pigmento vermelho extracelular em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono, demonstrando menor potencial do que o uso de pH estático durante o cultivo em biorreator. O manitol provou ser uma fonte eficiente de carbono para *M. purpureus* sob condições de pH estático, tanto para cultivo em frasco quanto em biorreator de bancada.

**Palavras-chave:** biorreatores; corante fúngico; condição de bioprocessos; metabólitos secundários

## 4.1 Introdução

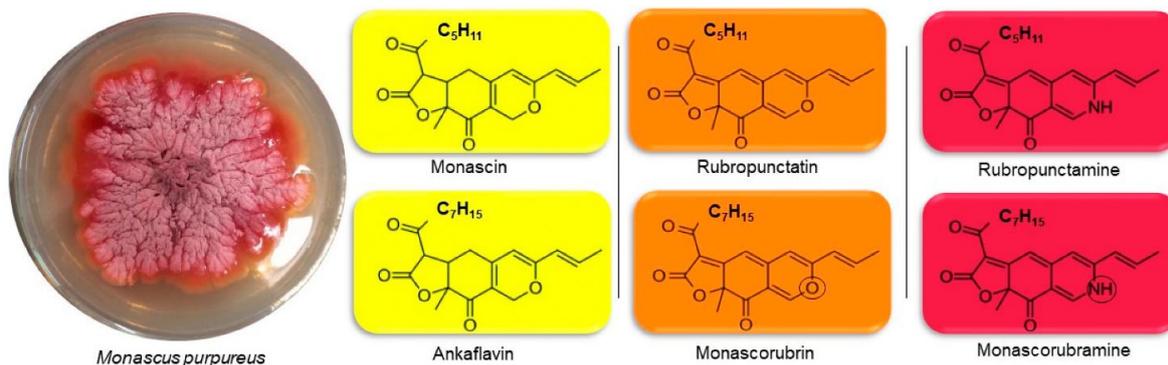
A cor é uma propriedade sensorial dos alimentos com papel relevante no processo de aceitabilidade e escolha do produto pelo consumidor [1]. A indústria alimentícia tem utilizado corantes sintéticos para fornecer, melhorar ou corrigir a cor de alimentos processados [2,3]. Alguns deles, como eritrosina, carmoisina e ponceau 4R [4], têm sido intimamente associados a efeitos colaterais como hiperatividade em crianças, alergenicidade, problemas toxicológicos e carcinogenicidade [5,6,7].

Nesse contexto, destacam-se pigmentos como carotenoides, antocianinas e betacianinas de fontes naturais (plantas, animais e microrganismos) [8]. Os pigmentos naturais são considerados seguros, não tóxicos, não cancerígenos, biodegradáveis e com baixo risco ao meio ambiente [9]. O comércio global de corantes naturais em 2011 foi de cerca de 600 milhões de dólares, equivalente a um aumento de 29% face a 2007, com um crescimento anual superior a 7%. Nesse sentido, destacam-se os pigmentos naturais obtidos por microrganismos [10].

Os pigmentos obtidos por fermentações microbianas apresentam diversas vantagens sobre os pigmentos extraídos de fontes vegetais/animais, como baixo custo de produção, rendimentos mais elevados, etapas de extração e purificação mais simples e limpas, sem variação sazonal, bem como facilidade de escalabilidade [11,12].

O gênero *Monascus* é bem conhecido por produzir metabólitos como lovastatina e polissacarídeos, além de pigmentos como monascina e ankaflavina (amarelo), rubropunctatina e monascorubrina (laranja) e rubropunctamina e monascorubramina (vermelho-púrpura) (Figura 4) [13]. O gênero *Monascus* é descrito como aeróbio, saprofítico, prototrófico, mesófilo (temperatura ótima de 30–35 °C) e com metabolismo respirofermentativo. Quando o fungo está em meio com excesso de glicose, *Monascus* sp. pode formar etanol em condições aeróbicas, podendo, portanto, ser classificado como *Cabtree* negativo com respiração limitada [14].

**Figura 4 -Estrutura dos pigmentos produzidos pelas espécies *Monascus*.** Estrutura aminofílica da rubropunctamina e da monascorubrina, que incorpora um grupo amina. Essa incorporação resulta em uma mudança de cor de laranja (rubropunctatina e monascorubrina) para vermelho-púrpura (rubropunctamina e monascorubramina).



*Monascus* sp. pode produzir pigmentos tanto em fermentação sólida, caso do arroz vermelho em países asiáticos como China e Japão, quanto em processos de fermentação submersa [15,16]. A fermentação submersa demonstrou boa homogeneização e controle de parâmetros do processo como oxigenação, pH e temperatura, que facilmente podem influenciar a produção de pigmentos *Monascus* [17].

Alguns estudos avaliaram o resultado da alteração de vários componentes do meio de cultura e sua resposta quanto à produção de pigmento por *M. purpureus* [18, 19, 20]. Esses componentes são fatores que limitam o crescimento do fungo e a produção de metabólitos. Nesse sentido, a escolha da fonte de carbono/nitrogênio é essencial para garantir o crescimento de *M. purpureus*, além de interferir diretamente no custo do processo produtivo. Pesquisas relacionadas a *M. purpureus* indicaram que glicose [21,22], sacarose [21] e glicerol [21,22] como fontes de carbono podem maximizar a produção de pigmento vermelho, enquanto estudos com outras fontes de carbono ainda são escassos.

O manitol é um poliol de seis carbonos, abundante na biosfera, tendo esta molécula recebido uma infinidade de funções em fungos filamentosos, incluindo armazenamento de carboidratos, um reservatório de poder redutor, tolerância ao estresse e deslocamento e/ou dispersão de esporos. Por estas razões, o manitol parece ser uma fonte interessante de carbono para o crescimento de microrganismos, especialmente fungos [23].

Porém, até agora, até onde sabemos, o cultivo deste fungo utilizando o manitol como única fonte de carbono não foi alcançado. Por conseguinte, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso do manitol em comparação com outras fontes de carbono na produção do pigmento vermelho de *M. purpureus* e a ampliação do processo para o biorreator de bancada.

## **4.2. Materiais e métodos**

### **4.2.1 Microorganismos e Meios de Cultura**

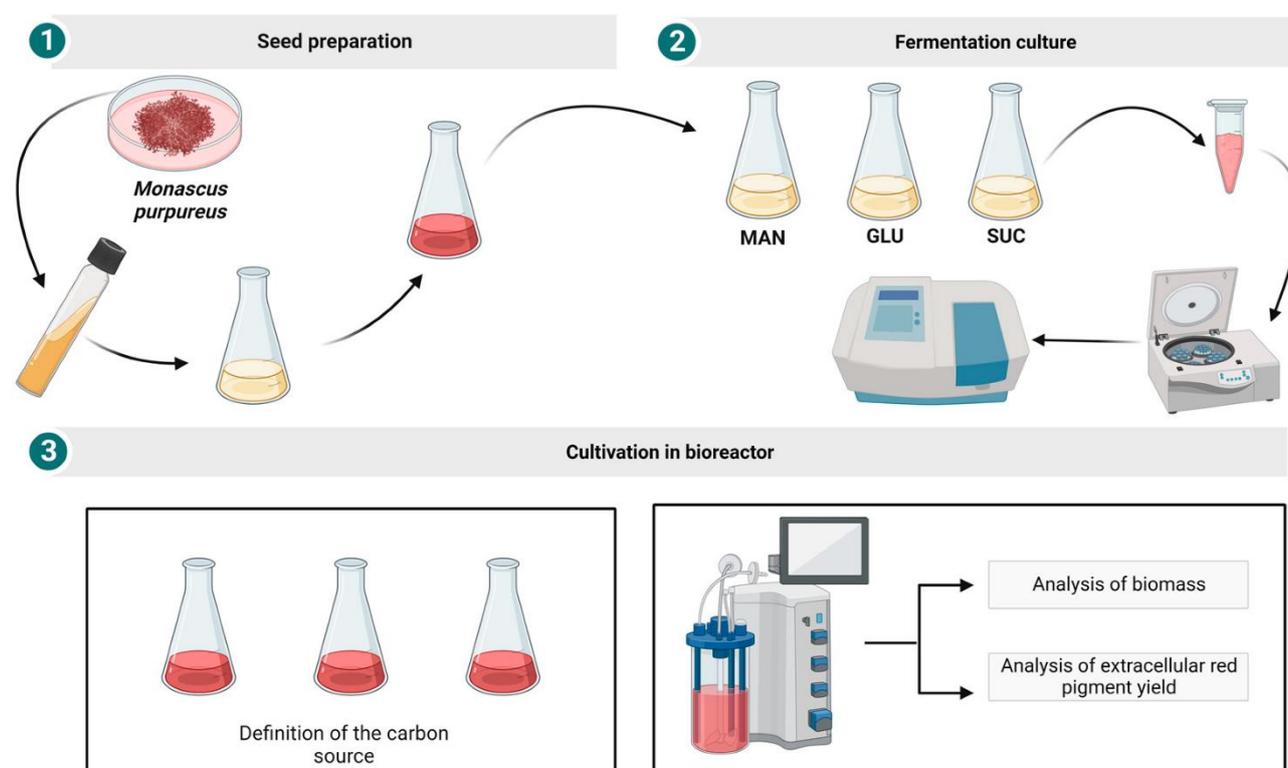
A cepa de *M. purpureus* ATCC 36928 lote T19/05/H foi adquirida da Fundação André Tosello – Coleção de Culturas Tropicais (Campinas, Brasil), liofilizada e mantida sob refrigeração a 4 °C até ser inoculada em placas de Petri contendo meio sólido (BDA).

O meio ágar batata dextrose (BDA) foi composto por infusão de batata (200 g/L), glicose (20,0 g/L) e ágar (17,0 g/L). O meio semente foi composto por glicose (20 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (1 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (0,5g/L). O meio de fermentação foi composto por fonte de carbono (60 g/L) (glicose, sacarose ou manitol), peptona (5 g/L), extrato de levedura (1 g/L),  $\text{KH}_2 \text{PO}_4$  (1 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1g /L). O pH do meio foi ajustado para 7,0 pela adição de NaOH (5M) e HCl (1N). Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

#### 4.2.2 Cultivos de Erlenmeyer e Biorreator de Bancada

A cepa de *M. purpureus* foi inoculada em tubos inclinados (*slants*) contendo meio BDA e incubados em estufa BOD (TECNAL, Piracicaba, Brasil) por sete dias a 30 °C. Após o período de incubação, uma suspensão de esporos fúngicos na ordem de 10<sup>6</sup> esporos/mL foi transferida para frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio semente. Esses frascos foram incubados em agitador orbital a 300 rpm e 28 °C por três dias (Figura 5 (1)).

**Figura 5 - Esquema de cultivo de *Monascus purpureus*.** A **etapa 1** consistiu na transferência do fungo para as inclinações e, após o tempo de incubação, foi feita a transferência das inclinações para os frascos. A **etapa 2** consistiu na fermentação em diferentes fontes de carbono. A **etapa 3** consistiu no cultivo em biorreator.



Um volume do caldo fermentado em meio semente de 1% (v / v) foi transferido para frascos de 500 mL contendo 100 mL de meio de fermentação com uma única fonte de carbono: manitol (MAN), glicose (GLU) ou sacarose (SUC). Os frascos foram incubados em agitador orbital a 140 rpm e 30 °C por quatro dias, e amostras de 1 mL foram coletadas em triplicata a cada 24 horas (Figura 2 (2)).

O cultivo em biorreator (4 L BIO-TEC-PRO TECNAL, Piracicaba, Brasil) foi feito com 3,0 L de volume útil. O pH foi controlado em 7,0, pela adição de NaOH 1M e HCl 1N, conforme necessário. A temperatura foi mantida em 30°C e a concentração de oxigênio dissolvido (DOC) foi

mantida acima de 40%, variando a velocidade de agitação com o fluxo de ar comprimido a 1 volume de ar por volume de meio por minuto (vvm). Um volume de suspensão fúngica a 1% (v/v) foi transferido para o biorreator e amostras foram coletadas ao longo do cultivo a cada 12 h (Figura 2 (3)). Na tentativa de maximizar a produção de pigmento extracelular, foi conduzido um segundo experimento, variando o pH conforme relatado por Orozco e Kilikian [20]. Neste caso, o cultivo foi iniciado com pH 5,5, posteriormente corrigido para pH 8,5 (após 30 h de cultivo conforme explicado no item 3.3). Para a alteração do pH, a demanda de oxigênio foi observada considerando a variação do oxigênio dissolvido no meio (OD), medida por um sensor (Hamilton, Nevada, EUA).

#### 4.2.3. Produção de biomassa celular e pigmento vermelho extracelular

A determinação da biomassa celular foi feita pela metodologia de massa seca, método gravimétrico. Resumidamente, uma alíquota (1 mL) de amostra em um microtubo de 2 mL, previamente pesado e identificado, foi centrifugada a 12.000× g por 10 minutos. O sobrenadante foi destinado à leitura do pigmento extracelular, e o sedimento celular foi ressuspensado em 1 mL de água destilada e novamente centrifugado, seguido de secagem em estufa a 70 °C até peso constante. A massa seca obtida foi dividida pelo volume inicial de amostra, e a concentração celular, expressa em gramas por litro. Foi feita uma varredura de comprimento de onda do sobrenadante em um espectrofotômetro UV1800 (Shimadzu, Kyoto, Japão) para definir o comprimento de onda máximo, que foi ajustado em 496,20 nm para coloração vermelha. A taxa de produção de pigmento foi calculada dividindo o valor obtido para concentração de pigmento (UA) pela biomassa (g).

#### 4.2.4. Cálculo da Taxa Máxima de Crescimento Específico, Coeficiente de Produção de Pigmentos por Biomassa e Produtividade

A taxa máxima de crescimento específico ( $\mu_{max}$ ) foi calculada através da inclinação do gráfico  $\ln$  da concentração de biomassa versus tempo durante a fase exponencial da curva de crescimento celular (Equação 1).

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = \mu t \quad (1)$$

O coeficiente de produção de pigmento pela biomassa ( $\frac{Y_p}{X}$ ) foi obtido como sendo a inclinação do gráfico da concentração de pigmento em função da concentração de biomassa (Equação 2).

$$\text{Coeficiente de produção de pigmento pela biomassa } \left(\frac{Y_p}{X}\right) = \frac{P}{X} \quad (2)$$

Finalmente, a produtividade foi obtida usando a Equação 3.

$$\text{Produtividade (P)} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (3)$$

Em que P e X são as concentrações de pigmento e biomassa (g/L), respectivamente, e  $t_i$  e  $t_f$  são os tempos inicial e final, respectivamente.

#### 4.2.5. Análise Estatística

O erro experimental foi obtido através do desvio padrão das amostras em triplicata. Os resultados da comparação entre fontes de carbono foram avaliados por média e desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey a 5% de significância.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1 Efeitos de Diferentes Fontes de Carbono na Produção de Biomassa Celular por *Monascus purpureus* em Frascos Agitados

A Figura 6 mostra os efeitos das diferentes fontes de carbono na produção de biomassa celular de *M. purpureus*. Nas primeiras 24 h de cultivo, o comportamento da biomassa celular não variou muito nas fontes estudadas, indicando que o microrganismo estava passando por uma fase de adaptação ao meio de cultivo. Após a inoculação, a concentração celular muitas vezes passa por um período de estase, denominado fase de latência, que representa um tempo de adaptação a seu ambiente, quando ocorre a síntese de enzimas adaptativas. O tempo nesta fase depende tanto da mudança na composição dos nutrientes quanto da idade e do tamanho do inóculo [ 24 ]. Embora o meio de glicose utilizado neste estudo tivesse a mesma composição do meio de semente, neste meio de cultura, a concentração de glicose foi 3× maior (60 g/L) do que no meio de semente (20 g/L), com aumento no gradiente de concentração de glicose no meio.

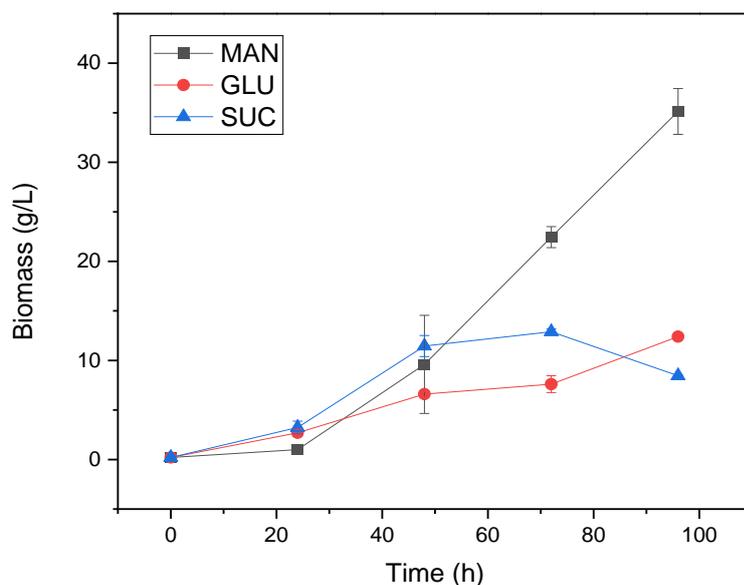
**Figura 6 - Cultivo de *Monascus purpureus* após 48 h sob diferentes fontes de carbono (MAN: manitol, GLU: glicose e SUC: sacarose) em cultivo submerso.**



Após 24 h, os tratamentos GLU e SUC produziram maiores concentrações de biomassa, 2,7 e 3,2 g/L, respectivamente, do que o tratamento MAN, 1 g/L. Dentro de 48 horas de cultivo, a produção de biomassa não mostrou diferença significativa entre os tratamentos ( $p = 0,4996$ ) (Figura 3).

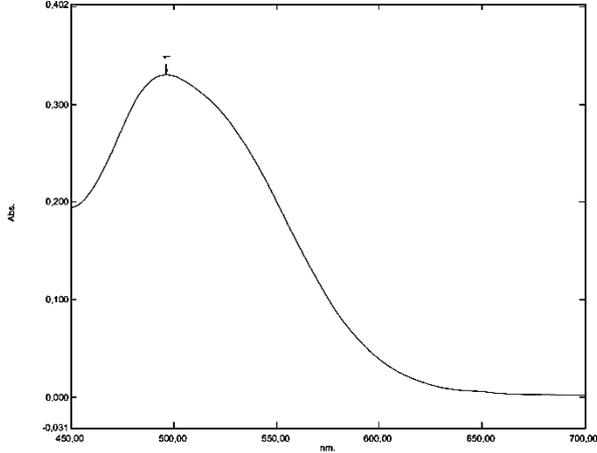
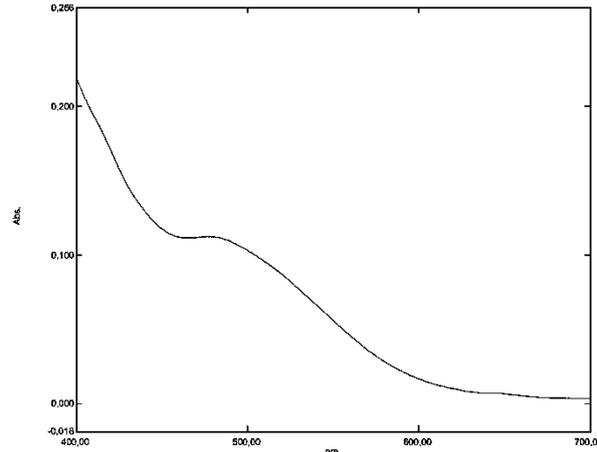
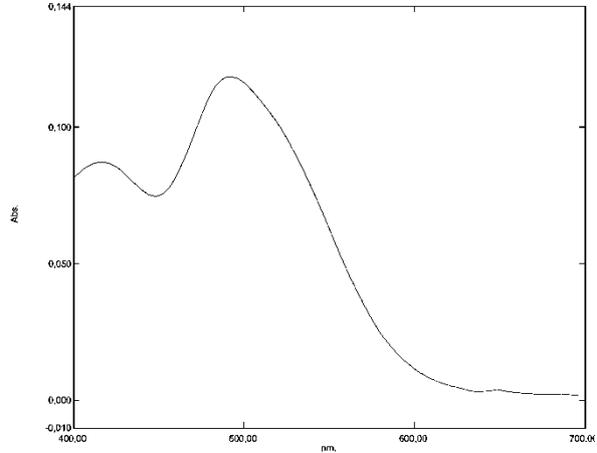
Com 96 h de cultivo, o tratamento MAN apresentou concentração de biomassa celular de 35,1 g/L, superando os tratamentos GLU e SUC em, aproximadamente, 2,8 e 4 vezes, respectivamente (Figura 7).

**Figura 7** - Biomassa de *Monascus purpureus* sob diferentes fontes de carbono (MAN: manitol, GLU: glicose e SUC: sacarose) em cultivo submerso.



A Tabela 3 mostra a mudança de cores obtidas após 24 e 48 h, tendo sido possível observar que (i) o tratamento MAN passou de uma tonalidade vermelha clara no primeiro dia para uma tonalidade vermelha intensa no último dia, obtendo uma única tonalidade vermelha, pico de absorvância, na faixa de 496,2 nm, considerado como absorvância máxima; (ii) o tratamento GLU mudou de uma tonalidade amarelo dourada nas primeiras 24 h para uma tonalidade laranja após 48 h de cultivo, não apresentando pico de absorvância na faixa vermelha (450–600 nm); e (iii) o tratamento SUC mudou de uma tonalidade vermelha clara para uma tonalidade laranja intensa no último dia, mostrando dois picos de absorvância, 420,5 e 496,2 nm. A diferença estatística foi demonstrada nos tratamentos MAN  $\times$  GLU e MAN  $\times$  SUC ( $p = 0,01$ ). Embora dois picos tenham sido obtidos no tratamento SUC, o melhor comprimento de onda para uma determinada solução é aquele em que há maior absorção e, portanto, menor transmissão de luz [25]. Assim, estabeleceu-se que a leitura da absorvância da solução contendo o pigmento seria feita em 496,20 nm.

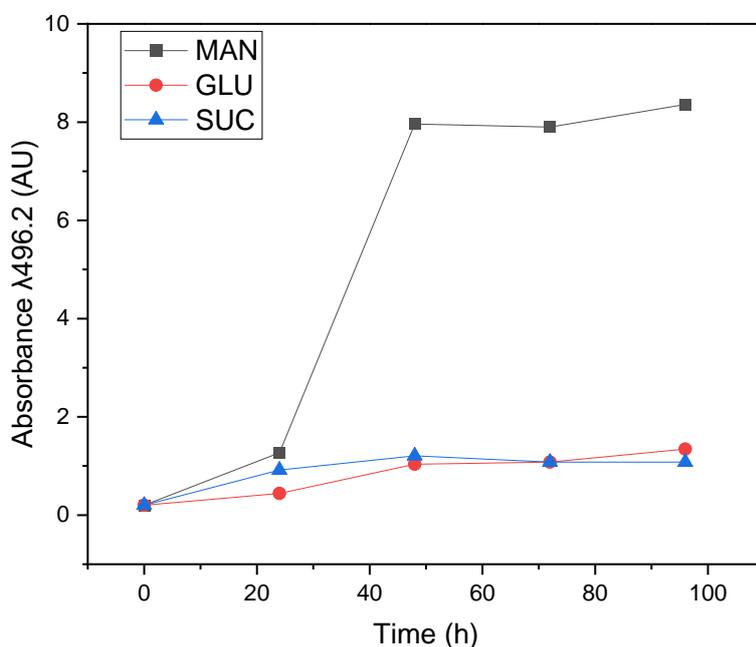
Tabela 3 - Diferença de cores absorvidas por espectrofotometria em 24 e 48 h sob diferentes fontes de carbono (MAN: manitol, GLU: glicose e SUC: sacarose) em cultivo submerso.

Fonte de Carbono	24 horas	48 horas	Gráfico de espectro
MAN			
Absorbância $\lambda_{496,2}$ (AU)	1.27	7.96**	
GLU			
Absorbância $\lambda_{496,2}$ (AU)	0.44	1.03	
SUC			
Absorbância $\lambda_{496,2}$ (AU)	0.91	1.20	

\*\*Mostra diferença significativa entre as amostras ( $p = 0,01$ ).

A produção de pigmento vermelho extracelular foi impactada pela mudança na fonte principal de carbono, tendo a maior produção do pigmento sido observada no tratamento MAN (8,36 UA) (Figura 8). Em contraste, as outras fontes de carbono testadas neste ensaio mostraram uma concentração final de 1,34 e 1,08 UA para os tratamentos com GLU e SUC, respectivamente. O pico de absorbância ( $\lambda 496.2$ ) obtido no presente estudo para o tratamento MAN, que está diretamente relacionada à concentração de pigmento vermelho, foi duas vezes maior que a obtida por Almeida et al. [16], que utilizaram meio de cultura contendo peptona (30 g/L), farelo de milho (42,5 g/L) e outros sais.

**Figura 8 - Figura 8. Pigmento vermelho de *Monascus purpureus* sob diferentes fontes de carbono (MAN: manitol, GLU: glicose e SUC: sacarose) em cultivo submerso.**



No presente trabalho, a máxima produção do pigmento vermelho foi obtida após 48 h (Figura 9) no tratamento MAN. Silbir e Goksungur [26] relataram que não houve produção de pigmento vermelho de *M. purpureus* ao mesmo tempo em meio contendo bagaço de cerveja hidrolisado, glutamato monossódico (8 g / L) e ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,01 g /EU). Esses autores também demonstraram que a produção de pigmento só excedeu 8,0 UA após 5 dias de cultivo, embora a proporção de inóculo utilizada tenha sido de 2% (v / v), ou seja, o dobro da utilizada no presente trabalho.

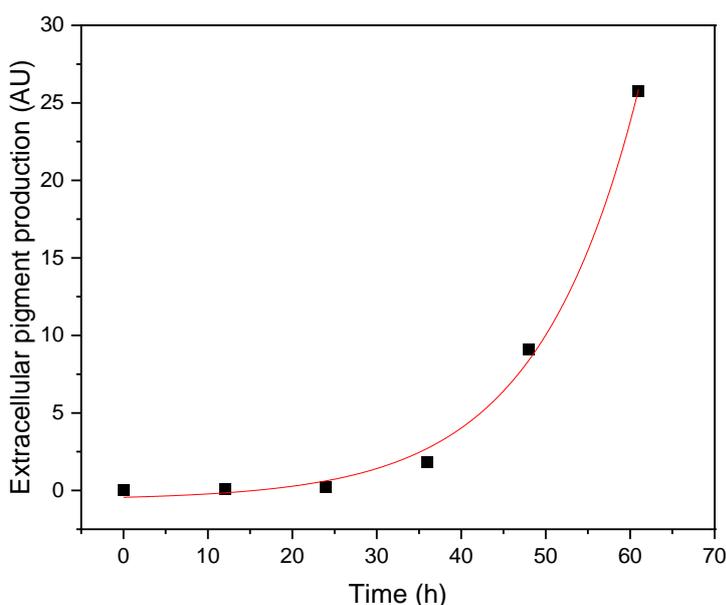
Embora o manitol pareça ser uma fonte promissora de carbono para a produção de biomassa celular e pigmento vermelho de *M. purpureus*, apenas um estudo avaliou a eficiência combinada de manitol, lactose e amido com semente de jaca como substrato na fermentação em estado sólido [27].

O manitol pode atuar de diferentes maneiras em fungos filamentosos, como na reserva de carboidratos [28,29], como protetor contra estresse osmótico e oxidativo [30,31] e na esporulação de fungos [32,33]. No entanto, o papel do manitol parece diferir de fungo para fungo [23], sendo assim, o papel do manitol *para M. purpureus* precisa de mais estudos.

#### 4.3.2. Cultivo em um biorreator usando manitol como fonte única de carbono

No cultivo em biorreator utilizando manitol como única fonte de carbono, foi obtida produção de pigmento vermelho por *M. purpureus* (Figura 9). Nas primeiras 24 h de cultivo, não houve produção de pigmento, como também mostra a taxa de produção de pigmento (Figura 12B). Esse comportamento já tinha sido descrito por Silbir e Goksungur [26] e pode indicar que o pigmento é um metabólito secundário, e sua produção ocorre exclusivamente após a fase de crescimento exponencial do microrganismo [34].

**Figura 9 - Produção de pigmento vermelho de *Monascus purpureus* sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH estático.**

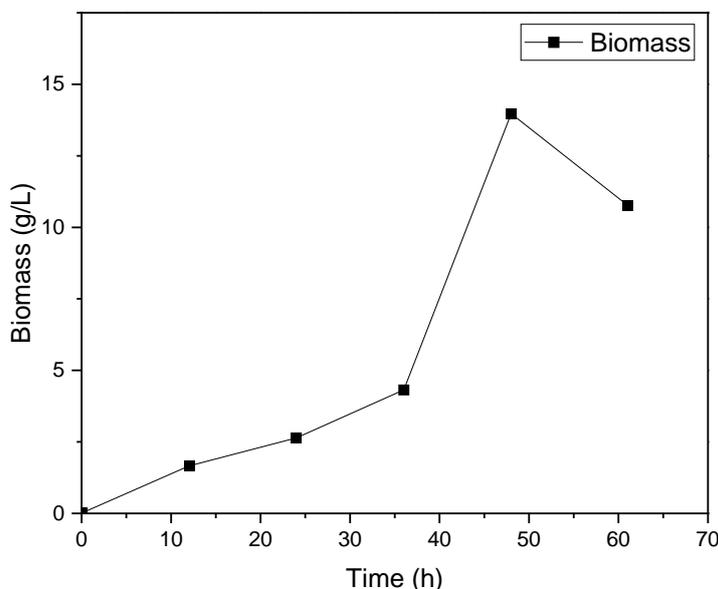


Após 61 h de cultivo, foram obtidos um perfil de produção exponencial acentuado durante a fase estacionária de crescimento celular e uma maior concentração de pigmento (25,5 UA), três vezes maior do que a obtida em frascos agitados com o mesmo meio de cultura, conforme descrito na Seção 3.1. Isto provavelmente foi devido ao controle de parâmetros que era possível no biorreator, como (i) pH, que foi mantido em 7 durante todo o cultivo do biorreator pela adição de NaOH 1M e HCL 1M por necessidade, e (ii) uma porcentagem de oxigênio dissolvido, que foi mantida em 40% para toda a cultura, variando agitação e 1 vmm de aeração. Nossa hipótese é que a manutenção desses parâmetros no biorreator diminuiu o tempo necessário para atingir uma alta

concentração de pigmento no meio. Embora Silbir e Goksungur [26] tenham demonstrado a possibilidade de obtenção de produção de pigmento vermelho acima de 20 UA após 7 dias de cultivo, no presente trabalho encontramos essa concentração de pigmento em apenas 61 h. Até onde sabemos, nosso resultado é a maior concentração de pigmento produzido por esse fungo obtida no menor tempo em um biorreator.

Após 48 h de cultivo em biorreator de bancada, Figura 7, foi obtida a máxima biomassa de *Monascus purpureus* (13,97 g/L), depois disso, foi observada diminuição na biomassa celular, embora a produção de pigmento continuasse a aumentar até 61 h (Figura 6). Essa diminuição da biomassa pode ser atribuída à autólise celular, que é a destruição de uma célula pela ação de enzimas produzidas por esse microrganismo [19].

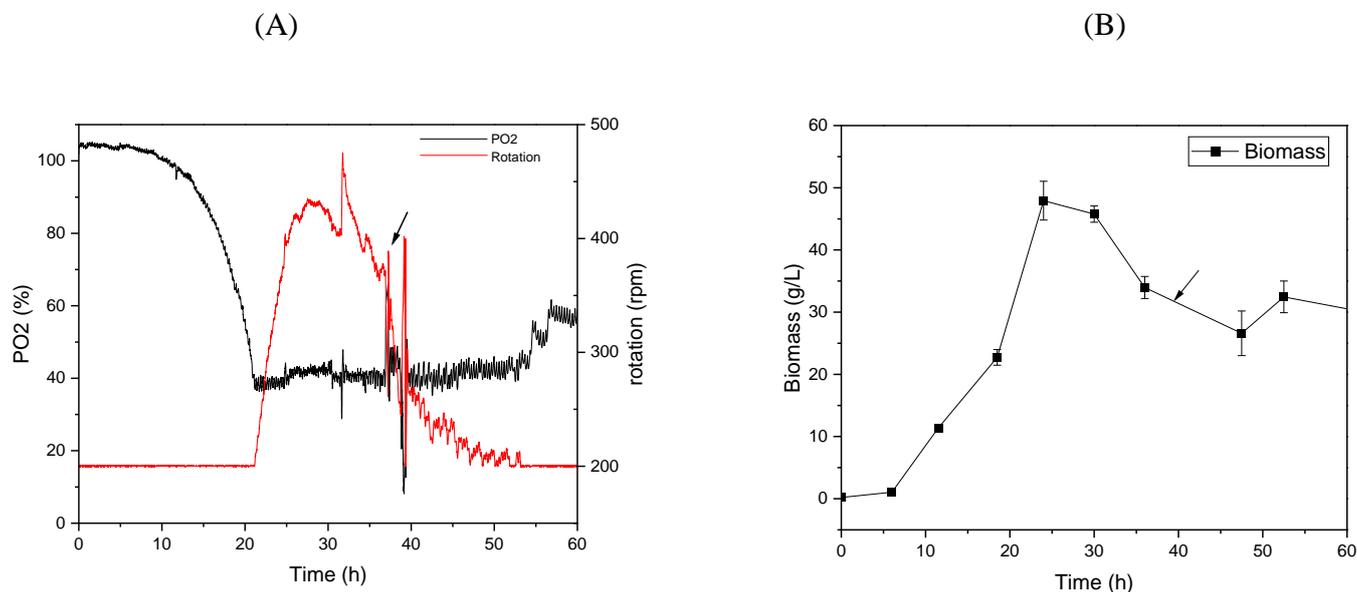
**Figura 10 - Biomassa de *Monascus purpureus* sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH estático.**



Orozco e Kilikian [ 20 ] observaram alta produção de pigmento vermelho (11,3 UA) de *M. purpureus* CCT3802 quando alteraram o pH de 5,5 na fase de crescimento do microrganismo para 8,5 na fase de produção de pigmento. Na tentativa de aumentar a produção de pigmentos, alteramos o pH estático ao longo do cultivo previamente testado para uma cultura com variação de pH de 5,5,,na fase de crescimento do microrganismo, a 8,5, na fase de produção de pigmentos.

A alteração do pH ocorreu quando uma menor demanda de oxigênio dissolvido (OD) pelo microrganismo foi detectada pelo sensor do biorreator, conforme indicado pela diminuição da velocidade de agitação com fluxo constante de ar comprimido ( Figura 8 A). Esta estratégia foi adotada considerando a relação entre a fase de crescimento microbiano e a demanda de oxigênio relatada por Pinches e Pallent [ 35 ]. Esses autores descreveram que a diminuição da concentração

de OD nos meios de cultura ocorre em razão da alta demanda durante o rápido crescimento do microrganismo até atingir a fase estacionária, com conseqüente aumento da concentração de OD, na medida em que a demanda se torna menor. Este perfil de DO também se ajusta ao comportamento de outros microrganismos descritos na literatura [ 36 ].



**Figura 11 - Concentração de oxigênio dissolvido (OD) (linha preta) porcentagem de oxigênio (PO<sub>2</sub>) e agitação (linha vermelha) (A) e biomassa (g/L) (B) em rotações por minuto (rpm) do *Monascus purpureus* com manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com variação de pH.**

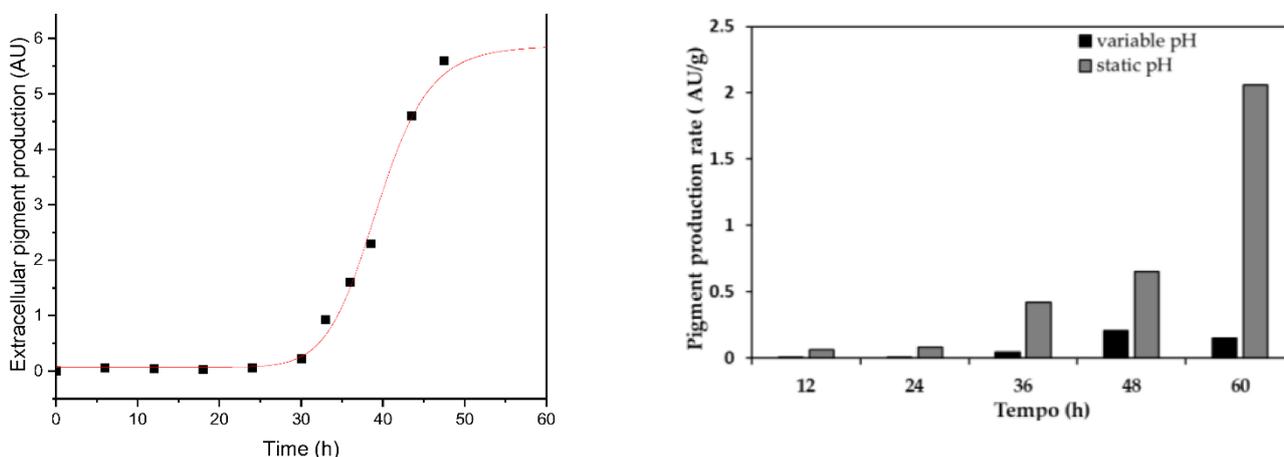
No presente trabalho, o OD diminuiu nas primeiras 20 h de cultivo sem alterar a velocidade de agitação (200 rpm). Após isso, houve aumento da agitação para suprir a demanda de oxigênio requerida pelos microrganismos, atingindo 450 rpm na trigésima hora, indicando aumento da atividade celular. Após 30 h de cultivo, a demanda de oxigênio diminuiu, indicando a fase estacionária de crescimento dos microrganismos, observada pela diminuição da necessidade de agitação (linha vermelha, Figura 8 A). Neste momento, houve mudança de pH para 8,5, indicada pela seta na Figura 8 A.

Durante as primeiras 24 h de cultivo (pH 5,5), observamos crescimento celular acelerado e alto rendimento em biomassa celular ( Figura 8 B) (47,9 g/L de biomassa seca) em comparação com o crescimento observado na cultura com pH constante 7 (2,64g/L). Às 38 h de cultivo, houve tendência à diminuição da biomassa celular, o que coincidiu com o momento em que o pH foi alterado de 5,5 para 8,5, confirmando o que observamos através da demanda de OD. No presente

trabalho, um pH de 5,5 mostrou maior produção de biomassa, mas a alteração do pH para 8,5 (às 37 h) para a etapa de produção do pigmento não aumentou a concentração extracelular do pigmento vermelho, diferentemente do relatado por Orozco e Kilikian [20].

A Figura 9 mostra a produção de pigmento vermelho por *Monascus purpureus* no biorreator variando o pH. Embora o fungo tenha começado a produzir pigmentos após 30 h de cultivo, como ocorreu nos demais experimentos, a concentração máxima de pigmento foi obtida após 48 h de cultivo, com valor de 5,65 UA, valor abaixo do encontrado para o experimento com pH estático, ao mesmo tempo (9,1 UA) ( Figura 6 ). Além disso, em nenhum momento em que o experimento foi controlado houve produção de pigmento demonstrada no experimento anterior.

**Figura 12 - (A)** Produção de pigmento vermelho *Monascus purpureus* sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH variável do meio, e **(B)** taxa de produção de pigmento sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator.



Por fim, o cálculo da taxa de produção de pigmento ( 12 B) corroborou os resultados discutidos anteriormente: (i) não houve produção de pigmento nas primeiras 24 h para o tratamento com pH variável, enquanto ocorreu alguma produção de pigmento para o tratamento com pH estático; e (ii) a taxa de produção de pigmento foi muito maior no tratamento com pH estático em comparação com o tratamento com pH variável.

#### 4.3.3 Cálculo da Taxa Máxima de Crescimento Específico, Coeficiente de Produção de Pigmentos por Biomassa e Produtividade

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para taxa máxima de crescimento específico  $\mu_{max}(h^{-1})$ , coeficiente de produção de pigmentos por biomassa  $Y_p \left( \frac{AU}{g} \right)$  e produtividade  $P \left( \frac{AU}{h} \right)$ . Embora os cultivos em biorreatores de bancada com pH estático ou variado tenham resultado em diferentes rendimentos de biomassa, as taxas máximas de

crescimento específico foram muito semelhantes ( $0,23 \text{ h}^{-1}$ ). Isso pode ser um indício de que a alteração do pH na cultura pode não causar variação na velocidade específica máxima de crescimento celular, mas apenas aumento na produção de pigmentos.

Os coeficientes de produção de pigmentos por biomassa e produtividade foram 3,8 e 3,5 maiores para o teste utilizando pH estático em comparação com os ensaios de pH variados. Como suspeitamos pela leitura da unidade de absorção do sobrenadante (Figura 9 A), o uso de pH estático 7 (com ajustes pela adição de NaOH para aumentar o pH e HCl para diminuir o pH, conforme descrito na Seção 2.2) ao longo do cultivo resultou em maior produção de pigmento vermelho por *M. purpureus*.

Tabela 4 - Taxa máxima de crescimento específico, coeficiente de produção de pigmento por biomassa e produtividade do pigmento vermelho *Monascus purpureus* sob manitol como fonte de carbono (MAN) em cultivo submerso em biorreator com pH estático e variável do meio.

	pH estático (7.0)	pH variável (5.5-8.5)
$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	0.2306	0.2323
$Y_p \left( \frac{\text{AU}}{\text{g}} \right)$	0.7523	0.1993
$P \left( \frac{\text{AU}}{\text{h}} \right)$	0.42	0.12

#### 4.4 Conclusões

O presente estudo demonstrou que o manitol foi eficiente como fonte de carbono tanto na produção de biomassa de *Monascus purpureus* quanto na produção de pigmento vermelho extracelular. Além disso, demonstramos que foi possível obter a mesma concentração de pigmento vermelho relatada em outros estudos em menor tempo, utilizando manitol como única fonte de carbono e cultivo controlado em biorreator.

Quando o pH foi mantido em 7, o cultivo em biorreator potencializou a produção de pigmento extracelular, que aumentou três vezes em comparação com o cultivo em frascos, indicando reprodutibilidade e escalabilidade para reatores industriais. O cultivo com pH variando de 5,5 a 8,5 no meio contendo manitol não se mostrou eficiente para aumentar a produtividade do pigmento, obtendo concentração bem menor que o cultivo com pH estático, embora pH 5,5 tenha produzido maior rendimento na concentração de biomassa. Mesmo assim, são necessários novos testes para entender como o manitol atua na condição de fonte de carbono no metabolismo de *M. purpureus*.

#### 4.5. Referências Bibliográficas

1. Downham, A.; Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, *35*, 5–22. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
2. Watson, D. *Food Chemical Safety: Volume 2: Additives*; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2002; Volume 2. [[Google Scholar](#)]
3. Burrows, J.A. Palette of our palates: A brief history of food coloring and its regulation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2009**, *8*, 394–408. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Mittal, J. Permissible synthetic food dyes in India. *Resonance* **2020**, *25*, 567–577. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler, D.; Dalen, L.; Grimshaw, K.; Kitchin, E.; Lok, K.; Porteous, L.; Prince, E. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: A randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet* **2007**, *370*, 1560–1567. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Potera, C. *Diet and Nutrition: The Artificial Food Dye Blues*; National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC, USA, 2010. [[Google Scholar](#)]
7. Oplatowska-Stachowiak, M.; Elliott, C.T. Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 524–548. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Fernández-López, J.A.; Fernández-Lledó, V.; Angosto, J.M. New insights into red plant pigments: More than just natural colorants. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 24669–24682. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Wrolstad, R.E.; Culver, C.A. Alternatives to those artificial FD&C food colorants. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2012**, *3*, 59–77. [[Google Scholar](#)]
10. Tuli, H.S.; Chaudhary, P.; Beniwal, V.; Sharma, A.K. Microbial pigments as natural color sources: Current trends and future perspectives. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 4669–4678. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
11. Galaffu, N.; Bortlik, K.; Michel, M. An industry perspective on natural food colour stability. In *Colour Additives for Foods and Beverages*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 91–130. [[Google Scholar](#)]
12. Panesar, R.; Kaur, S.; Panesar, P.S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: A review. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *1*, 70–76. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

13. Chen, W.; Chen, R.; Liu, Q.; He, Y.; He, K.; Ding, X.; Kang, L.; Guo, X.; Xie, N.; Zhou, Y. Orange, red, yellow: Biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 4917–4925. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
14. Chen, M.-H.; Johns, M.R. Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus*. *Enzym. Microb. Technol.* **1994**, *16*, 584–590. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Almeida, A.d.; Lima, T.d.; Santos, N.; Santana, R.; Santos, S.d.; Egea, M. An alternative for corn bran byproduct: Fermentation using *Monascus purpureus*. *Nutr. Food Sci.* **2019**, *50*, 515–527. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Almeida, A.d.; Santos, N.; de Lima, T.; Santana, R.; de Oliveira Filho, J.; Peres, D.; Egea, M. Pigment bioproduction by *Monascus purpureus* using corn bran, a byproduct of the corn industry. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2021**, *32*, 101931. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Yang, J.; Chen, Q.; Wang, W.; Hu, J.; Hu, C. Effect of oxygen supply on *Monascus* pigments and citrinin production in submerged fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, *119*, 564–569. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Keivani, H.; Jahadi, M.; Ghasemisepero, N. Optimizing submerged cultivation for the production of red pigments by *Monascus purpureus* on soybean meals using Response Surface Methodology. *Appl. Food Biotechnol.* **2020**, *7*, 143–152. [[Google Scholar](#)]
19. Huawei, Z.; Chengtao, W.; Jie, Q.; Bingjing, Z.; Bing, Z.; Chuangyun, D. Determining a suitable carbon source for the production of intracellular pigments from *Monascus purpureus* HBSD 08. *Pigment Resin Technol.* **2019**, *48*, 547–554. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Orozco, S.F.B.; Kilikian, B.V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 263–268. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Zhang, L.; Li, Z.; Dai, B.; Zhang, W.; Yuan, Y. Effect of submerged and solid-state fermentation on pigment and citrinin production by *Monascus purpureus*. *Acta Biol. Hung.* **2013**, *64*, 385–394. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Huang, Z.-R.; Zhou, W.-B.; Yang, X.-L.; Tong, A.-J.; Hong, J.-L.; Guo, W.-L.; Li, T.-T.; Jia, R.-B.; Pan, Y.-Y.; Lin, J. The regulation mechanisms of soluble starch and glycerol for production of azaphilone pigments in *Monascus purpureus* FAFU618 as revealed by comparative proteomic and transcriptional analyses. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 626–635. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Solomon, P.S.; Waters, O.D.; Oliver, R.P. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 257–262. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

24. Clarke, K.G. *Bioprocess Engineering: An Introductory Engineering and Life Science Approach*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013. [[Google Scholar](#)]
25. Stavenga, D.; Smits, R.; Hoenders, B. Simple exponential functions describing the absorbance bands of visual pigment spectra. *Vis. Res.* **1993**, *33*, 1011–1017. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Green Version](#)]
26. Silbir, S.; Goksungur, Y. Natural red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation systems, using a food industry waste: Brewer's spent grain. *Foods* **2019**, *8*, 161. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Green Version](#)]
27. Subhasree, R.; Babu, P.D.; Vidyalakshmi, R.; Mohan, V.C. Effect of carbon and nitrogen sources on stimulation of pigment production by *Monascus purpureus* on jackfruit seeds. *Int. J. Microbiol. Res. (IJMR)* **2011**, *2*, 184–187. [[Google Scholar](#)]
28. Corina, D.; Munday, K. Studies on polyol function in *Aspergillus clavatus*: A role for mannitol and ribitol. *Microbiology* **1971**, *69*, 221–227. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
29. Hult, K.; Veide, A.; Gatenbeck, S. The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch. Microbiol.* **1980**, *128*, 253–255. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Voegelé, R.T.; Hahn, M.; Lohaus, G.; Link, T.; Heiser, I.; Mendgen, K. Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiol.* **2005**, *137*, 190–198. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
31. Ruijter, G.J.; Bax, M.; Patel, H.; Flitter, S.J.; van de Vondervoort, P.J.; de Vries, R.P.; vanKuyk, P.A.; Visser, J. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 690–698. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
32. Webster, J.; Davey, R.; Smirnoff, N.; Fricke, W.; Hinde, P.; Tomos, D.; Turner, J. Mannitol and hexoses are components of Buller's drop. *Mycol. Res.* **1995**, *99*, 833–838. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Trail, F.; Xu, H. Purification and characterization of mannitol dehydrogenase and identification of the corresponding cDNA from the head blight fungus, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Phytochemistry* **2002**, *61*, 791–796. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
34. Schmidell, W.; de Almeida Lima, U.; Borzani, W.; Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial-Vol. 2: Engenharia Bioquímica*; Editora Blucher: São Paulo, Brazil, 2001; Volume 2. [[Google Scholar](#)]

35. Pinches, A.; Pallent, L.J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations, using complex and chemically defined growth media. *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28*, 1484–1496. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Santos, V.E.; Merchuk, J.C. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *49*, 289–307. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]