

SÉRIE TECNOLÓGICA DAS
PROTEÍNAS ALTERNATIVAS

Fermentação e processos fermentativos





Apresentação

O The Good Food Institute (GFI) é uma organização internacional sem fins lucrativos que trabalha para transformar o sistema de produção de alimentos. Nós atuamos no Brasil, Estados Unidos, Índia, Israel, em países da Europa e da região Ásia-Pacífico para construir um mundo onde proteínas alternativas não sejam mais alternativas. Somos financiados por filantropia, e todo nosso trabalho é prestado gratuitamente à sociedade. Nós existimos para tornar os sistemas alimentares melhores para o planeta, para as pessoas e para os animais. Para isso, identificamos as soluções mais efetivas, buscamos recursos e talentos e empoderamos parceiros em todo o sistema de alimentos, a fim de tornar as proteínas alternativas mais acessíveis.

Reimaginar a forma como obtemos proteína para consumo humano é urgente e fundamental. Produtos análogos aos de origem animal obtidos a partir de plantas são uma das alternativas concretas para ajudarmos o Brasil na sua transição para uma agricultura segura, justa e sustentável. Lado a lado com as proteínas sustentáveis de origem animal, podemos formar uma resposta consistente do nosso país e da nossa economia agrícola ao novo cenário, no qual diferentes fontes de obtenção de proteína para consumo humano conviverão.

Esse é um mercado “e” e não um mercado “ou”: há espaço e demanda para atuação de todos.

A importância de uma compilação robusta de dados sobre o estado-da-técnica no desenvolvimento deste segmento motivou o GFI Brasil, em parceria com o Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), a lançar este fascículo da Série Tecnológica em Proteínas Alternativas, abordando uma revisão bibliográfica abrangente sobre a tecnologia de fermentação para obtenção de ingredientes e produtos proteicos. São apontadas as principais características técnicas dos processos fermentativos, que englobam a fermentação tradicional, a fermentação para produção de biomassa e a fermentação de precisão, aplicados às proteínas alternativas. Refere-se à uma revisão bibliográfica de artigos internacionais publicados em anos recentes, com foco nos métodos de processos fermentativos, microorganismos usados e parâmetros operacionais, relacionados a essa tecnologia. Esperamos que este fascículo da Série Tecnológica em Proteínas Alternativas seja uma fonte de conhecimento sobre a tecnologia de produção de alimentos feitos de plantas análogos aos produtos de origem animal, partindo desse conjunto único de informações científicas aqui apresentado.

Ficha de Créditos

Autores

Neusely da Silva
Marta Hiromi Taniwaki
Patrícia Blumer Z. Rodrigues de Sá

Revisão

Katherine Helena Oliveira de Matos
Mariana Demarco
Cristiana Ambiel
Lorena Silva Pinho
Luciana Fontinelle
Isabela de Oliveira Pereira

Projeto Gráfico

Fabio Cardoso

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP

S586 Silva, Neusely da; Taniwaki, Marta Hiromi; Sá, Patrícia Blumer Z. Rodrigues de Fermentação e processos fermentativos / Neusely da Silva, Marta Hiromi Taniwaki e Patrícia Blumer Z. Rodrigues de Sá – São Paulo: Tiki Books: The Good Food Institute Brasil, 2022. (Série Tecnológica das Proteínas Alternativas) E-Book: PDF, 40 p.; IL

ISBN 978-65-87080-42-0

1. Alimentos. 2. Cadeia Produtiva Alimentar. 3. Tecnologia de Alimentos. 4. Inovação. 5. Proteínas Alternativas. 6. Fermentação. 7. Tecnologia de Fermentação. 8. Cultivo de Microrganismos. I. Título. II. Série. III. Processos de fermentação. IV. A fermentação tradicional. V. Fermentação para produção de biomassa. VI. Fermentação de precisão. VII. Silva, Neusely da. VIII. Taniwaki, Marta Hiromi. IX. Sá, Patrícia Blumer Z. Rodrigues de. X. Série Tecnológica das Proteínas Alternativas. XI. IFC/Brasil.

CDU 664

CDD 664

Catalogação elaborada por Regina Simão Paulino – CRB 6/1154

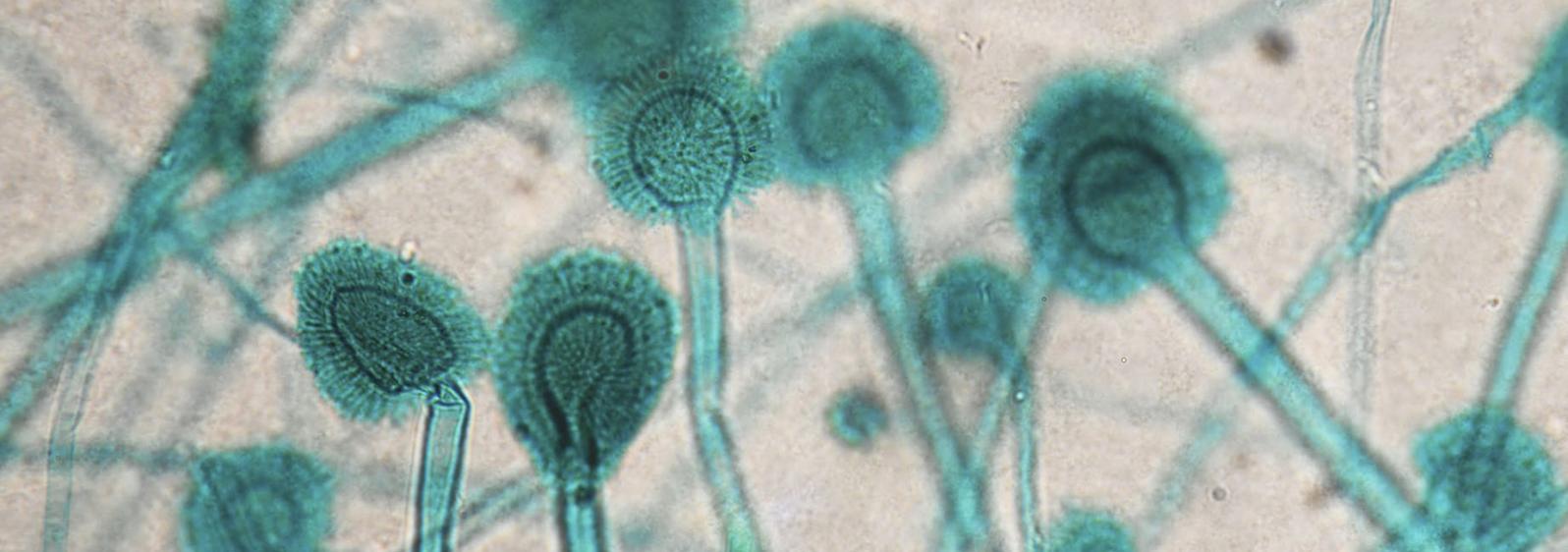
Índice

1. Introdução	5
2. Processos de fermentação	8
2.1. Processo de fermentação em estado sólido	9
2.2. Processo de fermentação em superfície de meio líquido	10
2.3. Processo de fermentação líquida submersa	11
2.4. Processo de fermentação submersa em reator <i>airlift</i> para produção da biomassa	14
2.5. Extração e purificação de proteínas obtidas por fermentação	17
3. A fermentação tradicional	18
4. Fermentação para produção de biomassa	20
4.1. Produção de biomassa de fungos	22
4.2. Produção de biomassa de bactérias	26
4.3. Produção de biomassa de algas	27
5. Fermentação de precisão	30
5.1. Microrganismos usados para a produção de novas proteínas por fermentação de precisão	32
Saiba mais	34
Referências	35

1. Introdução



Carne produzida com fermentação de biomassa. Crédito: Meati Foods.



Visão microscópica de fungo *Aspergillus*. Fonte: Adobe Stock.

Há centenas de anos a fermentação tem sido usada para conservar alimentos e melhorar seu valor nutritivo. No século XX esse processo expandiu-se para uma gama muito mais ampla de aplicações, abrangendo química industrial, biomateriais, medicamentos, combustíveis e aditivos alimentares avançados. No século XXI está ocorrendo um novo salto tecnológico, com a produção em larga escala de proteínas alternativas às de origem animal e vegetal tradicionais.

O termo **fermentação** aplicado à indústria de proteínas alternativas refere-se ao cultivo de microrganismos com a finalidade de processar um alimento ou ingrediente, obter mais do próprio microrganismo como fonte primária de proteína (biomassa) ou obter ingredientes específicos, como aromatizantes, enzimas, proteínas e gorduras, para incorporação em produtos feitos de plantas ou carne cultivada.

Os agentes de fermentação são microrganismos amplamente distribuídos na natureza, incluindo bactérias, fungos e algas. As bactérias são microrganismos unicelulares procariontes usados tradicionalmente na fabricação de produtos lácteos, cárneos e vegetais fermentados, como iogurte, salame e chucrute, por exemplo. Já os fungos são microrganismos eucariontes divididos em dois grupos: as leveduras, fungos unicelulares muito usados na fermentação de pães e bebidas alcoólicas; e os fungos filamentosos (também chamados de bolores), pluricelulares, compostos de longos filamentos de células (hifas) que se ramificam e se entrelaçam formando os micélios. Os bolores são tradicionalmente usados na fabricação de queijos (curados por fungos azulados ou brancos) e alimentos orientais como *tempeh*, *natto* e *misso*. As algas constituem um grande e diversificado grupo de organismos, incluindo espécies autotróficas unicelulares ou multicelulares, que produzem a energia necessária ao seu metabolismo por meio de fotossíntese.

A fermentação tem sido utilizada atualmente de três formas para incrementar o suprimento de proteínas na dieta humana:



Tempeh



Micoproteína. Crédito: Promyc



Gordura obtida por fermentação de precisão. Crédito: Melt&Marble

a) Fermentação tradicional, na qual são adicionados microrganismos vivos a uma matriz proteica de origem vegetal ou animal, com a finalidade de, por meio da sua multiplicação e da produção de compostos de metabolismo, desenvolver características sensoriais mais atrativas e/ou melhorar o valor nutricional e a biodisponibilidade das proteínas.

b) Fermentação para produção de biomassa, na qual são adicionados microrganismos vivos a um substrato nutritivo natural ou a um meio de cultura formulado, com a finalidade de promover a multiplicação das células microbianas e, posteriormente, utilizar o próprio microrganismo (ou seja, a biomassa celular) como fonte de proteínas e outros constituintes de interesse alimentar.

c) Fermentação de precisão, na qual o material genético que codifica uma determinada proteína em uma planta ou animal (doador) é inserido em um microrganismo (hospedeiro) de crescimento rápido e eficiente, que é então cultivado por fermentação para formar a proteína desejada em grande quantidade. Essa pode ser subsequentemente separada das células hospedeiras e purificada, resultando numa molécula idêntica à produzida na planta ou animal, com as mesmas características sensoriais e funcionais da original nos alimentos aos quais seja incorporada. A fermentação de precisão, além de ser utilizada para produção de proteína, também é aproveitada na produção de importantes ingredientes para o setor de *plant-based*, como aromas, gorduras, vitaminas, pigmentos, entre outros.

2. Processos de fermentação



Imagem ilustrativa de um laboratório. Fonte: Adobe Stock.



Há três formas básicas de conduzir um processo de fermentação: fermentação em estado sólido; fermentação em superfície de meio líquido; e fermentação submersa. Qualquer um desses processos permite a obtenção tanto de biomassa microbiana quanto de proteínas.

Imagem ilustrativa de biorreatores. Fonte: Adobe Stock.

2.1 Processo de fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é definida por Chen (2013) como aquela na qual o substrato é fermentado em condição sólida e umidificado por um filme líquido. O processo originou-se nas formas tradicionais de fermentação, usados, por exemplo, na produção do pão, que envolve o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* na massa sólida, dos queijos curados, com o cultivo de fungos azulados ou brancos durante a cura, do *tempeh*, que utiliza do cultivo do fungo *Rhizopus oligosporus* em grãos de soja cozidos ou do *ang-kak*, ou do “arroz vermelho”, que aproveita do cultivo do fungo *Monascus purpureus* em arroz cozido.

A partir desses usos tradicionais o processo foi aprimorado para muitas outras aplicações, particularmente com a introdução de suportes sólidos inertes para ancorar o crescimento microbiano. Na moderna fermentação em estado sólido o substrato pode ser de dois tipos:

a) **Nutritivo**, como no uso tradicional, servindo tanto como estrutura física para o crescimento do microrganismo, quanto como fonte de nutrientes. As inovações nesse caso são resultantes da variedade de substratos usados (farelos e tortas prensadas obtidas na extração de óleo de vários grãos, por exemplo), como também da finalidade da fermentação, que ultrapassou o clássico enriquecimento nutricional e/ou sensorial de matérias primas comestíveis, passando a ser também usado na produção de biomassa microbiana e na fermentação de precisão na área de alimentos.

b) **Poroso inerte**, como espuma de poliuretano, resina macroporosa, perlita ou vermiculita, servindo apenas de suporte, enquanto os nutrientes são fornecidos por meio de cultura fluido, distribuído nas lacunas do suporte poroso. Essa inovação permite maior controle na pureza dos insumos nutritivos e maior facilidade na colheita das células ou dos bioprodutos gerados pelos microrganismos.

O conteúdo de água do substrato sólido pode ser mantido na faixa de 12% a 80%, normalmente ficando em torno de 60%. Em contraste, o conteúdo de água típico da fermentação líquida é acima de 95%.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos, mas os últimos são os organismos mais bem adaptados e dominam as aplicações práticas. O modo de crescimento das hifas oferece uma grande vantagem a esses microrganismos na colonização do substrato e na utilização dos nutrientes disponíveis, dada sua capacidade de penetrar no material sólido.

2.2 Processo de fermentação em superfície de meio líquido

Esse tipo de fermentação foi patenteado em 2017 para o cultivo de fungos filamentosos na superfície de um meio de cultura líquido, sem qualquer suporte sólido (Patente WO 2017/151684A1). O processo é baseado na característica de crescimento dos fungos filamentosos que, quando cultivados em um caldo nutritivo estático, formam uma camada de biomassa micelial na superfície do líquido, denominada biomata. Isso aplica-se a fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucorales*, *Rhizopus*, entre outros.

Esse processo pode ser usado para a produção de biomassa e também de enzimas e outras proteínas, carboidratos, lipídeos, aminoácidos, vitaminas e qualquer outro produto de metabolismo de fungos,

geneticamente modificados ou não. A biomassa pode ser consumida diretamente como ingrediente alimentar ou as proteínas podem ser extraídas e purificadas.

a) Condições do processo



Produção de biomassa de fungo em reator de bandejas.
Crédito: Nature's Fynd

Para o crescimento do fungo é usado um reator de bandejas, com bandejas de plástico rasas acomodadas num rack de aço revestido de cromo. A dimensão das bandejas pode ser adaptada ao usuário (por exemplo, há reatores com bandejas de 41,27 × 31,75 × 2,54 cm ou 61,28 × 41,27 × 2,54 cm). O rack com as bandejas é envolto por um filme plástico transparente, criando uma espécie de câmara de fermentação, cuja finalidade é minimizar a contaminação pelo ambiente e controlar as condições de temperatura, umidade e fluxo de ar. Ar umidificado estéril é continuamente insuflado na câmara à velocidade controlada, de forma a garantir aeração e umidade e, por arraste, remover o CO₂ e o calor gerado na multiplicação dos fungos. A temperatura da câmara é mantida a 25 ± 2 °C durante toda a fermentação.

b) Meio de cultivo



Imagem ilustrativa de meio de cultivo. Fonte: Adobe Stock.

O meio de cultivo pode estar na forma líquida, em gel (com todos os nutrientes dissolvidos, inclusive as fontes de carbono) ou na forma de uma base nutritiva líquida, na qual a fonte de carbono é adicionada como substrato sólido particulado em suspensão. Também pode ser usada a base líquida nutritiva cobrindo o substrato sólido, fonte de carbono. Nesse último caso, o substrato sólido é submerso sob a superfície da base líquida, de modo que a biomata cresce na superfície do líquido usando o carbono derivado do sólido submerso. Enzimas extracelulares excretadas pelos fungos degradam o substrato de carbono sólido, liberando carbono solúvel que pode ser absorvido pela biomata na interface biomata/líquido. Em geral, a camada de líquido acima da fonte de carbono submersa deve ter cerca de 0,01 a 1,0 cm de profundidade.

Dependendo da fonte de carbono utilizada, a composição do meio base é ajustada para acomodar a contribuição de nutrientes

originada da fonte de carbono. Os fungos podem ser cultivados sem a adição de qualquer antibiótico ao meio de cultura, com pouca ou nenhuma contaminação, a qual é normalmente causada, no meio artificial, por outros microrganismos (bactérias, leveduras e bolores indesejáveis), algas, plantas e insetos.

Após a fermentação, que leva de três a 12 dias a depender da espécie de fungo, a biomassa pode ser coletada da superfície do líquido sem adição de qualquer solvente e encaminhada a tratamentos posteriores, de acordo com a finalidade de uso.

2.3 Processo de fermentação líquida submersa

A fermentação líquida submersa é definida por Renge, Khedkar e Nandurkar (2012) como o cultivo de microrganismos submersos em um caldo rico em nutrientes (o meio de fermentação), em reatores fechados e normalmente sob agitação, para manter uma alta concentração de oxigênio. Parâmetros como temperatura, pH, consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono são medidos e controlados para otimizar a fermentação. A maior parte dos processos submersos utiliza reatores do tipo tanque com agitação mecânica, promovida por um eixo vertical com vários agitadores em forma de pá, conforme mostrado na Figura 1.

Na Figura 1, Arnau, Yaver e Hjort (2020) descrevem as etapas básicas de um processo genérico de fermentação submersa

para produção de enzima por um fungo hospedeiro geneticamente modificado. O fungo em geral é cultivado em um meio pré-definido esterilizado. A linhagem é inicialmente inoculada em um frasco e, após cinco a dez dias, dependendo do microrganismo, os esporos ou células são coletados e transferidos para um tanque de fermentação de médio porte. Decorridos um a quatro dias, a cultura é então adicionada a um tanque maior, em que a produção da enzima é induzida por alimentação com um indutor. Tanto o pH como a temperatura do meio são controlados, sendo a temperatura mantida por água resfriada (Arnau et al., 2020). Além das enzimas, outras proteínas de interesse nutricional podem ser obtidas da mesma forma.

Resumidamente, uma cultura advinda de um banco de culturas é cultivada em um meio sólido a fim de gerar uma quantidade de esporos suficiente para inocular um tanque de fermentação de médio porte (*seed fermenter*). Nessa etapa é gerada biomassa fúngica suficiente para a produção em grande escala, mas ainda sem indução da produção de enzima. A biomassa é então usada como inóculo para o tanque de fermentação principal (de 5000 L ou maior), no qual ocorre a indução da produção de enzima.

A etapa seguinte é a recuperação da enzima. Na maioria dos processos fermentativos envolvendo fungos, as enzimas são secretadas no meio de cultura durante a fermentação, não exigindo a ruptura celular (*lise*) para a liberação. Uma vez terminada a fermentação, a enzima pode ser recuperada diretamente do meio ou do caldo de cultura, o que envolve várias operações (Figura 2). O caldo fermentado é tratado para remover o microrganismo (floculação seguida de filtração ou centrifugação) e o material é, então, concentrado por ultrafiltração, seguindo-se uma etapa de estabilização e subsequente esterilização por filtração (remoção de contaminantes microbianos). O caldo contendo a proteína é usado para a formulação de um produto líquido ou sólido (granulado) (Arnau et al., 2020).

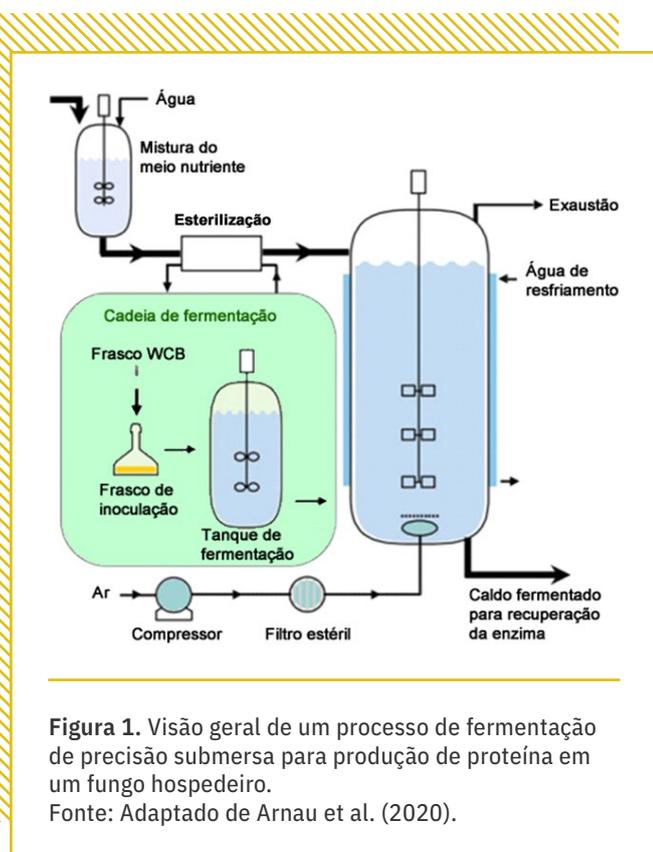
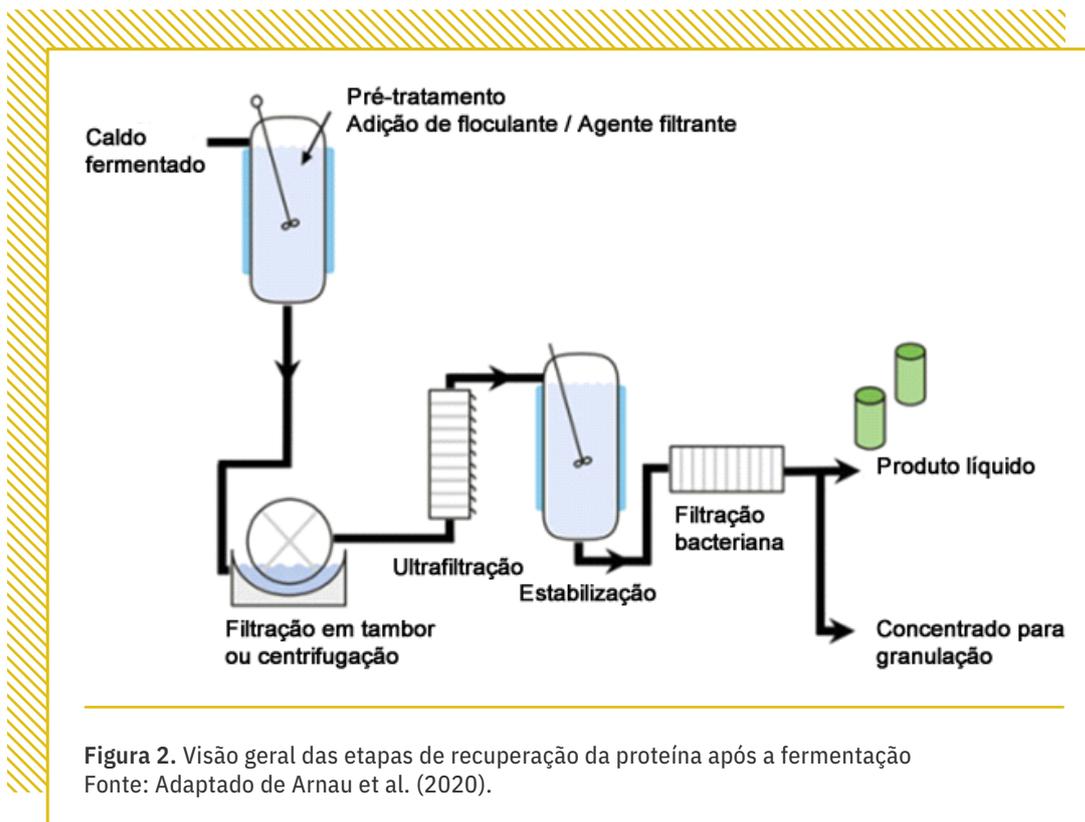


Figura 1. Visão geral de um processo de fermentação de precisão submersa para produção de proteína em um fungo hospedeiro.
Fonte: Adaptado de Arnau et al. (2020).



Inicialmente é adicionado ao caldo um agente floculante, para floculação dos resíduos celulares e posterior remoção do material floculado por filtração em tambor ou centrifugação. O caldo livre de células é, então, submetido a uma etapa de ultrafiltração, para concentração da enzima. Em seguida o material é estabilizado e esterilizado por filtração em membrana (para remoção de contaminantes microbianos) e pode ser desidratado ou concentrado em sua forma final.

As enzimas ou outras proteínas obtidas por meio desse processo são um concentrado do sobrenadante do meio de cultura, sem separação física/bioquímica de moléculas puras. Em função disso, impurezas e compostos do metabolismo do fungo, como micotoxinas, devem ser controlados

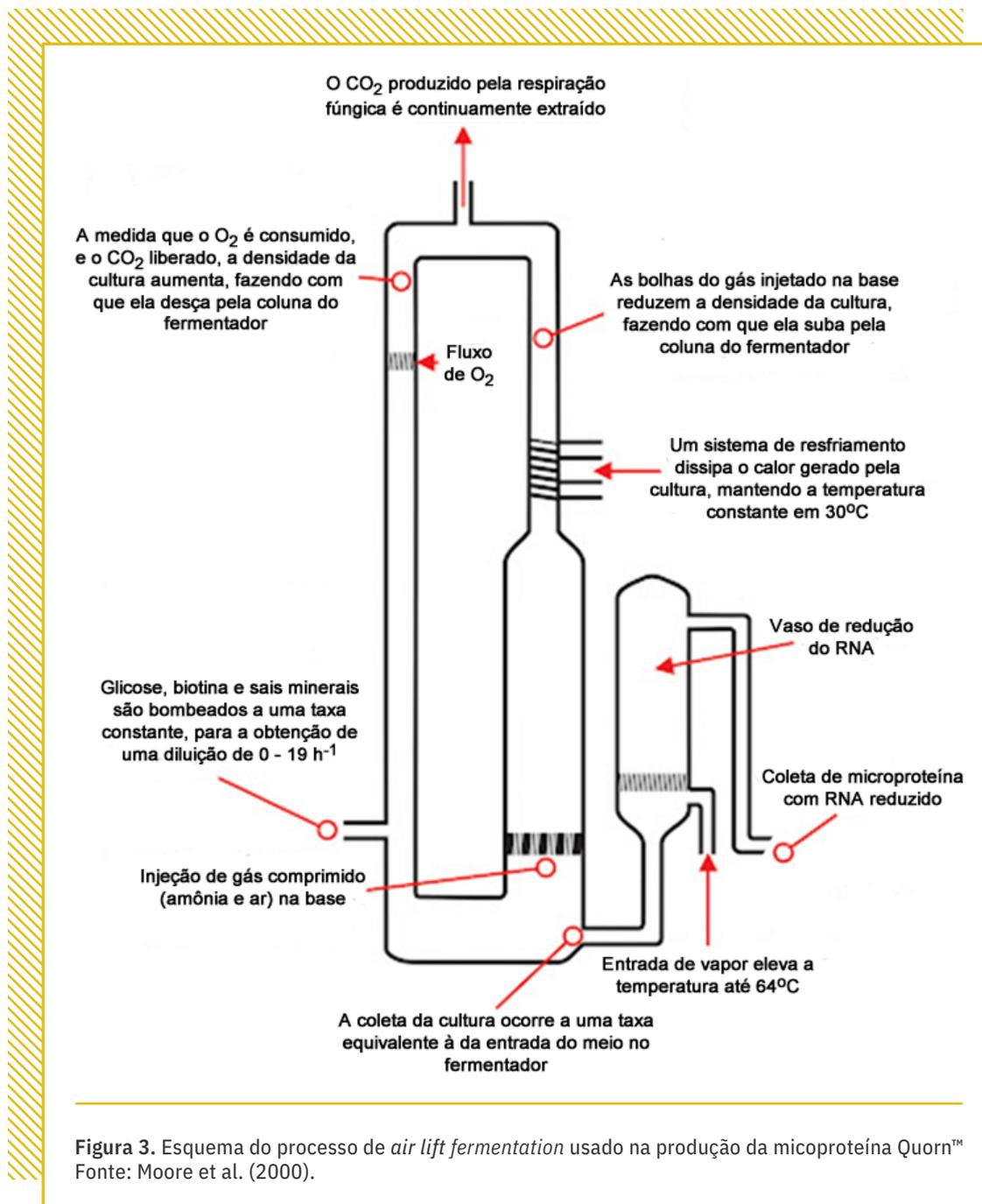
e monitorados durante todo o processo, na intenção de garantir a segurança do produto final.

2.4 Processo de fermentação submersa em reator *airlift* para produção da biomassa

O reator *airlift* é outro tipo de reator usado na fermentação submersa, em que não são utilizados agitadores para a aeração do meio líquido. Esse processo, chamado de *airlift fermentation*, é bastante utilizado na produção de biomassa, e um dos exemplos de sua aplicação é a produção da biomassa do fungo filamentosso *Fusarium venenatum*, denominada micoproteína. O produto foi lançado com a marca registrada Quorn™, pertencente à Marlow Foods Ltd, uma *joint venture* formada em 1984 entre as empresas

britânicas Ranks Hovis McDougall (RHM) e Imperial Chemical Industries (ICI), que já usava esse processo para produzir uma biomassa celular bacteriana (Pruteen®) para ração animal.

O processo de *airlift fermentation* usado para a produção da *Single Cell Protein* (SCP) Quorn™ foi descrito por Moore, Robson e Trinci (2000) e encontra-se esquematizado na Figura 3.



O fermentador consiste num *loop* alongado (*riser*) com duas seções. O meio de cultura é bombeado continuamente numa seção, e uma mistura de gases comprimidos (ar estéril e amônia) é injetada na outra seção. A diferença na carga hidrostática entre as seções fornece a força motriz para a circulação do líquido e a turbulência cria excelentes condições para a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Conforme o líquido sobe, o oxigênio é consumido e CO_2 é produzido pela cultura, sendo expulso pela redução da pressão no topo do *riser*. Com o aumento da densidade a cultura desce, sendo novamente insuflada de ar, completando o ciclo de pressão. A cultura com os filamentos de hifas crescentes circula continuamente, sendo mantida a cerca de 30°C por um trocador de calor colocado no tubo de descida. A taxa de suprimento de nitrogênio para o crescimento (gás amônia na mistura gasosa) é regulada por um monitor configurado para manter o pH da cultura em 6,0. A taxa de suprimento de glicose é operada para garantir que esse composto esteja sempre em excesso, de forma a obter velocidade de crescimento específica máxima (μ_{max}).

O fermentador funciona 24 horas por dia. Os testes para a presença de micotoxinas são feitos a cada 24 horas, usando um método com sensibilidade para 2 ppb. Como o fungo está crescendo a μ_{max} e as toxinas são metabólitos secundários produzidos por crescimento lento ou culturas estacionárias, a síntese de micotoxinas é evitada.



Biorreator *Airlift*. Crédito: Sartorius

A massa celular é colhida continuamente, mas antes passa por um tanque acoplado ao fermentador, onde é tratada para redução do teor de ácido ribonucléico (RNA). A massa celular de fungos normalmente apresenta um conteúdo relativamente alto de RNA em comparação com fontes tradicionais de proteína, como carne, peixe ou soja. O RNA ingerido dá origem a purinas e pirimidinas, e as purinas são subsequentemente convertidas em ácido úrico, composto que potencializa o risco de gota e pedras nos rins em indivíduos suscetíveis. O *United Nations Protein Advisory Group* da Organização das Nações Unidas (ONU) recomendou, em 1972,

que proteínas de massa celular destinadas ao consumo humano não forneçam mais de duas gramas de RNA por dia. A especificação para o nível de RNA na micoproteína é de no máximo 2% da massa seca. Para a redução do RNA, a temperatura da biomassa é elevada a 68°C por 20 a 30 minutos, interrompendo o crescimento e ativando as RNAases endógenas, que quebram o RNA e liberam os nucleotídeos para o meio de cultura. Como as RNAases são mais resistentes ao calor do que as proteases, a perda de proteínas é minimizada, embora uma quantidade significativa ainda seja perdida. Após esse processo, resta na micoproteína apenas 1% de RNA (m/m), semelhante à quantidade presente no fígado animal e dentro do limite superior de 2% (m/m) recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Após a redução do RNA, a biomassa fúngica é colhida, apresentando, em base seca, cerca de 44% de proteína, 18% de fibra dietética e apenas 13% de gordura (os valores para a carne bovina são 68%, 0% e 30%, respectivamente). Essa massa ou “pasta” de micoproteína é então tratada para a formação da textura semelhante à da carne, que caracteriza a biomassa Quorn™.

Para a texturização podem ser adicionados diferentes agentes gelificantes e firmadores, como albumina de ovo (ou proteínas de ervilha e batata em produtos veganos), alginato, ágar ou goma de alfarroba. O gel é posteriormente congelado, sendo a textura final alcançada após o congelamento inicial e durante cerca de duas semanas

de armazenamento congelado. Ao final o produto oferece a mesma sensação de “mastigação” e suculência da carne.

O processo fermentativo foi originalmente desenhado para funcionar indefinidamente, mas na prática é encerrado a cada mil horas (cerca de seis semanas) após o início do fluxo contínuo. Isso se dá devido a mutações naturais que ocorrem na cultura: a biomassa composta por mutantes apresenta a mesma composição química e nutricional da linhagem parental, mas a textura da micoproteína muda, tornando-se mais friável (mais fácil de desintegrar-se). O processo então precisa ser encerrado, dando início a um novo ciclo fermentativo.

2.5 Extração e purificação de proteínas obtidas por fermentação

Na produção de biomassa o produto de interesse obtido na fermentação são os próprios microrganismos, enquanto na fermentação de precisão são as proteínas sintetizadas pelos microrganismos, que precisam ser separadas das células e recuperadas. Dois tipos de situações devem ser consideradas na recuperação: (a) se a proteína é secretada no meio de cultura; ou (b) se a proteína é acumulada no interior das células. Ferraz (2010) apresentou uma revisão das etapas de recuperação de enzimas, que se aplicam a qualquer proteína e permitem uma visão geral dos procedimentos nessas duas situações.

Em ambos os casos a recuperação tem início no líquido fermentado ou, se a fermentação foi feita em estado sólido, no líquido de extração do substrato. A primeira etapa é uma separação sólido-líquido para remoção das células do microrganismo, que normalmente envolve operações como floculação, centrifugação e filtração.

No caso das proteínas extracelulares, o caldo livre das células segue diretamente para uma etapa subsequente de concentração das proteínas por ultrafiltração, na qual são utilizadas membranas filtrantes que permitem a passagem dos compostos de baixa massa molar e retêm as proteínas.

Já nas proteínas intracelulares as células separadas do caldo são submetidas a um processo de lise para liberação das proteínas, antes da concentração. Há vários processos que podem ser usados para romper as células, como ultrassom, digestão com álcalis e digestão enzimática, mas industrialmente os mais aplicados são a moagem em moinhos de bolas de vidro e a ruptura sob alta pressão, métodos mecânicos que não envolvem compostos químicos. Após a *lise* é feita uma nova separação sólido-líquido para eliminar os fragmentos insolúveis de células. O sobrenadante pode seguir direto para a ultrafiltração, porém é comum a necessidade de etapas adicionais para remoção de outros constituintes intracelulares, particularmente ácidos nucleicos.

Dependendo do grau de pureza desejado, o concentrado rico em proteínas pode ser usado diretamente na formulação de ingredientes alimentares ou seguir para etapas posteriores de purificação, a fim de obter a molécula quimicamente pura.

Os processos de obtenção de proteínas puras quimicamente definidas são os mesmos aplicados à produção de enzimas alimentares, podendo ser usados, entre outros, precipitação por salificação (*salting out*), precipitação isoelétrica, precipitação por solventes, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, eletroforese, diálise, ultrafiltração e ultracentrifugação.

3. A fermentação tradicional



Imagem ilustrativa de espetinhos de *tempeh*. Fonte: Unsplash.



Exemplos de fermentação tradicional já foram citados anteriormente, na abordagem do processo de fermentação em estado sólido. Dentre eles, um tipo de produto que se destaca como exemplo do potencial de aplicação da fermentação tradicional na oferta de proteínas é o *tempeh*. Nesse produto o micélio fúngico é cultivado nos grãos de soja para reduzir o conteúdo de fatores antinutricionais, aumentar a digestibilidade e melhorar o sabor, sendo a massa micelial também consumida e funcionando como fonte adicional de nutrientes.

Incontáveis fontes vegetais de proteínas e resíduos vegetais de processamento de alimentos não são usados na alimentação humana em função dos mesmos problemas de sabor, digestibilidade e conteúdo de fatores antinutricionais observados na soja. A aplicação da fermentação tradicional a essas matérias primas pode permitir a obtenção de novos ingredientes alimentares proteicos adequados à formulação de alimentos.

Por exemplo, a empresa Planetarians, de Palo Alto, Califórnia, usa a fermentação tradicional para melhorar a digestibilidade, o sabor, a textura e o perfil nutricional de subprodutos agroindustriais de baixo valor, como a torta prensada de girassol resultante da produção de óleo (Ford,



Imagem ilustrativa de *tempeh*. Fonte: Adobe Stock.

Ignaszewski, Oca, & Voss, 2020). A empresa MycoTechnology, de Aurora, Colorado, lançou um concentrado de proteína de ervilha e de arroz fermentado por shiitake, em que a biomassa micelial (inativada pelo calor) e as proteínas fermentadas são concentradas e desidratadas para obtenção de um ingrediente (Pure Taste®) com mais de 75% de proteína, usado na formulação de diversos produtos alimentícios (análogos de carne, misturas para panificação, misturas para sopas, produtos lácteos e análogos a produtos lácteos, massas, frutas processadas e sucos de frutas, vegetais processados e sucos de vegetais, barras de cereais etc.) em concentrações que variam de 1% a 40% de proteína (United States of America, 2020b). A fermentação reduz odor e sabor indesejáveis da matéria-prima e confere propriedades funcionais como texturização e retenção de água e óleo. A nova marca Planterra, da JBS, lançou uma linha de produtos *plant-based* usando o ingrediente da MycoTechnology na formulação (Ford et al., 2020).

4. Fermentação para produção de biomassa



Bacon produzido com fermentação de biomassa. Crédito: MyForest Foods Co.



Produto cárneo análogo produzido com fermentação de biomassa. Crédito: Mycorena.

A proteína da biomassa de microrganismos é chamada de *single cell protein* (SCP), embora muitos dentre os microrganismos produtores sejam multicelulares, como os fungos filamentosos e algumas algas. O termo SCP foi criado para evitar as conotações negativas trazidas por denominações como “proteína microbiana” ou “proteína bacteriana” (Trinci, 1992). Segundo Garibay, Ruiz, Cruz e Bárzana (2014), o conceito de SCP é aplicado ao crescimento massivo de microrganismos para consumo humano ou animal. É um termo genérico que se refere à proteína bruta ou purificada originada de células de bactérias, leveduras, bolores ou algas, que pode ser consumida diretamente como biomassa ou como um suplemento para aumentar o teor proteico de outros alimentos (Finnigan, Needham, & Abbott, 2017). A produção de biomassa tem importantes vantagens sobre outras fontes de proteínas: é produzida em pouco tempo, requer pouco espaço e não é afetada por condições climáticas. Além disso, os microrganismos podem multiplicar-se utilizando várias fontes de carbono.

Ao projetar um processo de fabricação de biomassa para consumo humano, vários requisitos básicos devem ser considerados:

- A fabricação deve ser economicamente viável para competir com outras alternativas mais bem estabelecidas, como o tofu e outros derivados da soja, por exemplo, bem como a própria carne e o leite.
- O organismo deve ser capaz de adequar-se à produção em larga escala e multiplicar-se para produzir quantidades suficientes do produto.
- Se o produto objetiva substituir fontes convencionais de proteína, deve ser rico em proteínas e fornecer vários aminoácidos essenciais.
- O organismo não pode ser patogênico nem produzir toxinas durante o processo de produção.
- Para suprir os níveis relativamente altos de proteínas necessários à dieta humana, deve ser obtida preferencialmente a partir de organismos que contenham pelo menos 30% de proteínas em sua biomassa.

Dessa forma, a produção de SCP é restrita a um número relativamente pequeno de espécies, ainda mais limitado devido a questões de segurança e a normas sobre alimentos para consumo humano em comparação à ração animal (Finnigan et al., 2017).

4.1 Produção de biomassa de fungos

Várias espécies de fungos já foram avaliadas para uso como biomassa, conforme mostrado no Quadro 1, que também traz os substratos utilizados na fermentação e o teor de proteína observado nas condições de cultivo.

Quadro 1. Fungos filamentosos e leveduras avaliados para a produção de biomassa para alimentação humana e animal.

Organismo	Substrato	Teor de proteínas (%)
<i>Actinomucor elegans</i>	NR*	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NR	
<i>Aspergillus flavus</i>	farelo de arroz	10
<i>Aspergillus niger</i>	bagaço de maçã	17-20
	resíduos de banana	18
	farelo de arroz	10-11
	stickwater	49
	resíduo de líquido	50
<i>Aspergillus ochraceus</i>	farelo de arroz	10
<i>Aspergillus oryzae</i> (deoiled)	farelo de arroz	24
<i>Candida krusei</i>	soro de queijo	48
<i>Candida lipolytica</i>	NR	
<i>Candida tropicalis</i>	melaço	56
<i>Candida utilis</i>	cama de frango	29
	resíduo de pimentão em pó	48
	resíduo do processo de amido de batata	46
<i>Chrysonilia sitophila</i>	lignina	39
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	farelo de arroz	10
<i>Debaryomyces hansenii</i>	hidrolisado com alto teor de hemicelulose de grãos já usados de cervejaria	32
<i>Fusarium moniliforme</i>	NR	
<i>Fusarium oxysporum</i>	NR	
<i>Fusarium semitectum</i>	farelo de arroz	10
<i>Fusarium venenatum</i> (Quorn)	glicose	44
<i>Geotrichum candidum</i>	NR	

<i>Hanseniaspora uvarum</i>	frutos deteriorados de tamareiras	49
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	soro de queijo	43
	bagaco de laranja, melado, grãos usados de cervejaria, soro, polpa de batata	59
<i>Monascus ruber</i>	farelo de arroz	10
<i>Penicillium citrinum</i>	farelo de arroz	10
<i>Pestalotiopsis westerdijkiae</i>	NR	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	NR	
<i>Pleurotus florida</i>	palha de trigo	63
<i>Rhizopus oligosporus</i>	NR	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	bagaco de laranja, melado, grãos já utilizados de cervejaria	24
<i>Thielavia terrestris</i>	NR	
<i>Trichoderma harzianum</i>	filtrado de soro de queijo	34
<i>Trichoderma viride</i>	polpa cítrica	32
<i>Yarrowia lipolytica</i>	inulina, óleo cru, hidrocarbonetos do resíduo de processamento de glicerol	48-54

*NR = não relatado

Fonte: Thrane (2007) e Ritala, Häkkinen, Toivari, & Wiebe (2017).

Produtos dos gêneros *Saccharomyces* e *Fusarium* já estão disponíveis comercialmente, e uma SCP de *Yarrowia lipolytica* também está sendo fabricada em pequena escala pela empresa polonesa Skotan S. A., em colaboração com as marcas *Yarrowia Equinox* e *Yarrowia GoodStart*.

A SPC de *Saccharomyces cerevisiae* gerada no processo de fermentação para produção de álcool de cana é amplamente usada na produção de diversos ingredientes alimentares. A Zilor, uma das maiores produtoras brasileiras de etanol e açúcar de cana, dispõe de uma unidade de negócios especialmente dedicada a este setor, a empresa Biorigin, que em 2008 adquiriu a PTX Food Corp., nos Estados Unidos, e a Immunocorp Animal Health, na Noruega, ampliando e fortalecendo sua presença internacional. Dentre os produtos derivados

da SPC de *Saccharomyces cerevisiae* há vários aromas, realçadores de sabor e uma linha (Goldcell) com ingredientes usados para aumentar o valor nutricional. Nessa linha há também um produto (Goldcell NY) produzido com massa celular da levedura *Torula*.

A biomassa de fungos tem sido predominantemente utilizada na fabricação de produtos usados como ingredientes em outros alimentos. Há uma classe de produtos derivados da biomassa dos fungos filamentosos, cuja função é aproveitar-se da estrutura altamente ramificada do micélio para criar textura semelhante à da carne. Enquanto os análogos à carne tradicionalmente produzidos (como hambúrgueres e nuggets vegetarianos) apresentam uma textura de carne finamente moída, os análogos produzidos com a

biomassa filamentosa buscam imitar a textura dos músculos inteiros. Um produto desse tipo é a micoproteína Quorn™, da britânica Marlow Foods. Mais recentemente a startup Meati Foods (anteriormente chamada Emery Foods), de Boulder, Colorado, criou

uma linha de bifes à base de fungos (Ford et al., 2020). Desde o sucesso do Quorn™, outros grupos começaram a produzir biomassa para consumo humano direto. No Quadro 2 são mostrados alguns desses produtos já disponíveis comercialmente.

Quadro 2. Produtos comerciais de biomassa de fungo produzida por fermentação.

	<p>Quorn™ Biomassa de <i>Fusarium venenatum</i>. Marlow Foods, Reino Unido¹.</p>		<p>FyProtein™ Biomassa de <i>Fusarium strain flavolopsis</i>. Nature's Fynd, USA⁴.</p>
	<p>Promyc™ Biomassa. Mycorena, Suécia².</p>		<p>Ferment IQ™ Biomassa de micélio de shiitake. Mycotechnology, USA⁵.</p>
	<p>Abunda® Biomassa. 3F Bio, Reino Unido³.</p>		<p>Hickory Bacon Biomassa. Prime Roots, USA⁶.</p>

¹ Recuperado de <https://www.quorn.co.uk>

² Recuperado de <https://mycorena.com>

³ Recuperado de <http://www.3fbio.com>

⁴ Recuperado de <https://www.naturesfynd.com>

⁵ Recuperado de <https://www.mycoiq.com/>

⁶ Recuperado de <https://www.primeroots.com/>

É importante salientar que a seleção de uma linhagem de fungo para produção de biomassa deve levar em consideração o fato de que certos gêneros têm uma alta diversidade de metabólitos secundários potentes e biologicamente ativos, incluindo micotoxinas altamente tóxicas, algumas mais nocivas do que qualquer toxina sintética feita pelo homem.

O *Aspergillus fumigatus* é conhecido como altamente patogênico a humanos por causar uma infecção pulmonar conhecida como aspergilose. A mortalidade da doença pode atingir até 85%, principalmente em pessoas imunocomprometidas. Em 1977, Khor, Alexander, Lumsden e Losos (1977), testando a viabilidade de produzir proteínas a partir de micélio de *A. fumigatus*, realizaram testes com ratos, mostrando que a micoproteína produzida era segura. Análises sobre a presença de aflatoxinas, citrinina, ocratoxinas, zearalenona, toxina T-2 e esterigmatocistina mostraram que essa espécie não produzia tais micotoxinas (Reade & Gregory, 1975). No entanto, hoje sabe-se que as micotoxinas testadas não são as produzidas pelo fungo, e o uso dessa espécie para produção de micoproteína não é recomendável.

O *Fusarium moniliforme* foi apontado como produtor de biomassa de alto valor nutricional a partir de substratos de baixo valor nos estudos de Drouliscos, Macris e Kokke (1976) e de Macris e Kokke (1978). Nesses trabalhos, os autores não avaliaram a produção de micotoxinas e, baseados

em experimentos com ratos, concluíram que o fungo não apresentava efeitos danosos. Estudos posteriores, entretanto, mostraram que *F. moniliforme*, renomeado como *F. verticillioides*, é um forte produtor de fumonisinas, que são carcinogênicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas, causadoras de leucoencefalomalácia, relacionadas a lesões necróticas no cérebro em equinos e a edema pulmonar em suínos. O consumo de alimentos contaminados com fumonisinas pode estar relacionado a casos de câncer esofágico em humanos (Desjardins, 2006; Murphy, Hendrich, Landgren, & Byrant, 2006).

Por sua vez, o *Aspergillus niger* é amplamente utilizado na produção de enzimas e ingredientes alimentares, sendo geralmente considerado um fungo benigno. A biomassa dessa espécie tem sido aproveitada em ração animal, utilizando como matérias-primas o farelo de cacau e resíduos de soja, entre outros (Amorim, 2011). *A. niger* tem status GRAS pela U. S. Food and Drug Administration (FDA), mas estudos sobre o genoma e o metaboloma do grupo *Aspergillus* section *Nigri* mostraram que algumas cepas de *A. niger* são capazes de produzir as micotoxinas ocratoxina A (OTA) e a fumonisinas B2, B4 e B6 (Frisvad, Smedsgaard, Samson, Larsen, & Thrane, 2007; Frisvad et al., 2011). A OTA é nefrotóxica e possivelmente carcinogênica (Grupo 2B) de acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC, 1993), e a fumonisina B2 é considerada citotóxica (Gutleb, Morrison, & Murk, 2002).

Considerando a seriedade dos metabólitos tóxicos formados pelos fungos filamentosos, é importante salientar que estudos mais aprofundados sobre o potencial de produção de micotoxinas e patogenicidade da cepa fúngica sempre serão necessários. Atualmente, a conservação da sequência em bancos de dados e a organização genômica das vias de biossíntese de micotoxinas permitem a identificação, a caracterização e até a previsão do potencial de uma determinada cepa para produzir micotoxinas, com base em sua sequência de genoma e

pela bioinformática (Desjardins, 2006; King, Brown, Urban, & Hammond-Kosack, 2018).

4.2 Produção de biomassa de bactérias

Várias espécies de bactéria já foram avaliadas para uso como SCP, conforme mostrado na Quadro 3, que também traz os substratos utilizados na fermentação e o teor de proteína observado nas condições de cultivo.

Quadro 3. Bactérias já avaliadas para a produção de biomassa para alimentação humana e animal.

Organismo	Substrato	Teor de proteínas (%)
<i>Bacillus cereus</i>	chifre de carneiro	68
<i>Bacillus licheniformis</i>	resíduo do processo de amido de batata	38
<i>Bacillus pumilus</i>	resíduo do processo de amido de batata	46
<i>Bacillus subtilis</i>	chifre de carneiro	71
	casca de soja	12
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	glicose + frutose	61
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	não informado	57-70
<i>Cupriavidus necator</i>	meio de cultivo sintético	40-46
<i>Escherichia coli</i>	chifre de carneiro	66
<i>Haloarcula sp.</i>	água residuária da indústria petroquímica	76
<i>Methylococcus capsulatus</i>	metano (gás natural)	67-73
<i>Ralstonia sp.</i>	metano (gás natural)	
<i>Brevibacillus agri</i>	metano (gás natural)	
<i>Aneurinibacillus sp.</i>	metano (gás natural)	
<i>Methylomonas sp.</i>	metano (sal)	69
Bactérias diazotróficas	água residual de cervejaria	> 55
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	água residual de processamento de borracha	55-65

Fonte: Ritala et al. (2017).

As bactérias têm um longo histórico de uso na produção de biomassa, porém a principal aplicação tem sido a alimentação animal. Numa busca no Inventário de Notificações GRAS da FDA, no período de 1998 (quando a agência começou a inventariar as notificações) até 20 de setembro de 2021, apenas duas notificações foram registradas: uma para uso como ingrediente em alimentos (GRN no 415/2012), e outra para uso como fonte de antioxidante (GRN no 700/2017).

A notificação GRN no 415/2012 da Meiju Co., Japão, se refere ao produto “cultura inativada de *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 em pó”, a ser usado como ingrediente em bebidas e bases de bebidas, cereais matinais, queijos, café e chá, gorduras e óleos, sobremesas e misturas lácteas congeladas, gelatinas, doces, pudins e recheios, produtos de grãos e massas, produtos lácteos, frutas processadas e sucos de frutas, vegetais processados e sucos de vegetais e doces em níveis que variam de 0,2 a 0,6 g por porção.

Já a GRN no 700/2017 da JX Nippon Oil & Energy Corp., Japão, está relacionada ao produto “extrato de *Paracoccus carotinifaciens* contendo carotenóides” (biomassa desidratada), para uso como fonte de astaxantina em produtos de panificação e misturas para panificação, bebidas e bases de bebidas, energéticos e isotônicos, cereais e produtos à base de cereais, gomas de mascar, café, chá, laticínios análogos de produtos lácteos e outros, sobremesas e misturas lácteas congeladas, balas, produtos lácteos, frutas e sucos de frutas processados,

vegetais e sucos vegetais processados, em níveis que fornecem 0,15 mg de astaxantina por porção.

Na aplicação para ração animal, ao contrário, a produção de biomassa bacteriana é muito bem estabelecida. Segundo dados levantados por Ritala et al. (2017), a biomassa bacteriana geralmente contém 50% a 80% de proteína em base seca e, assim como os fungos, possuem alto teor de ácido nucleico (8% a 12%), especialmente RNA. Portanto, requer processamento prévio para uso como alimento ou ração. Além da proteína, a SCP bacteriana fornece alguns lipídios e vitaminas do grupo B.

4.3 Produção de biomassa de algas

A produção de microalgas para consumo humano ou animal é particularmente promissora em função do alto teor de proteínas que pode ser encontrado em suas células, conforme mostrado no Quadro 4. O conteúdo de ácido nucleico é relativamente baixo (3% a 8%), e a biomassa também fornece gorduras, carotenóides, vitaminas A, B, C e, sais minerais e clorofila (Ritala et al., 2017).

Quadro 4. Relatos sobre o conteúdo de proteína de algumas algas de interesse como SCP.

Organismo	Teor de proteínas (%)
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	60-75
<i>Aphanothece microscopica</i>	42
<i>Arthrospira maxima (Spirulina maxima)</i>	60-71
<i>Arthrospira platensis (Spirulina platensis)</i>	46-63
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	45
<i>Chlorella sorokiniana</i>	46-65
<i>Chlorella spp.</i>	62-68
<i>Chlorella vulgaris</i>	42-55
<i>Euglena gracilis</i>	50-70
<i>Scenedesmus obliquus</i>	30-50

Fonte: Ritala et al. (2017).

Além do alto valor nutricional das proteínas e sua abundância, outro fator que torna esses organismos extremamente atraentes para a produção de biomassa é sua capacidade de utilizar eficientemente a luz como fonte de energia (Grossmann, Ebert, Hinrichs, & Weiss, 2018). As algas em geral são fotossintéticas e utilizam CO₂ como fonte de carbono e luz solar como fonte de energia. A produção por fotossíntese em tanques é a mais comum, embora algumas empresas trabalhem com a fermentação em reatores na produção de seus produtos, como a TerraVia, da Califórnia, com a fabricação da AlgaVia®.

Fotobiorreatores também têm sido usados para a produção de algas frescas, aproveitadas na aquicultura (moluscos, camarões e peixes) como fonte de ácidos graxos insaturados (como o ômega 3) e carotenóides, embora o teor proteico

também contribua para a nutrição (Ritala et al., 2017).

A biomassa de microalgas é usada principalmente na forma de suplementos, disponíveis em cápsulas, comprimidos e na forma líquida. Há, entretanto, um crescente desenvolvimento de produtos no formato de ingredientes, que podem ser adicionados a massas, produtos de panificação, petiscos, entre outros alimentos. Os produtos disponíveis comercialmente são derivados principalmente das seguintes espécies: *Arthrospira platensis* e *Arthrospira maxima* (comercializadas como spirulina); *Chlorella*, *Dunaliella salina* (comercializada principalmente como fonte de beta-caroteno); e *Aphanizomenon flos-aquae* e *Euglena* (comercializada principalmente como fonte de beta-glucanos, mas há também produtos com células íntegras).

As algas verdes unicelulares do gênero *Chlorella*, na forma de células intactas, têm proteínas de baixa digestibilidade devido à parede celular rígida. Vários métodos já foram aplicados para a ruptura das células, como dissolução alcalina, congelamento-descongelamento, ultrassom e líquidos iônicos (materiais semelhantes a sais que podem ser utilizados a temperaturas abaixo de 100°C na separação e extração de materiais bioativos de plantas, incluindo proteínas). Wang e Zhang (2012) avaliaram a aplicação de líquido iônico e de alta pressão em baixa temperatura para rompimento das células de *Chlorella pyrenoidosa*, comparando a estratégia aos métodos tradicionais. Os resultados indicaram que a taxa de extração com líquido iônico é moderada, mas alta pressão em baixa temperatura pode aumentar a taxa de extração de proteína em 2 a 15 vezes. Os autores avaliaram também a hidrólise das proteínas extraídas com três enzimas (papaína, tripsina e alcalase), obtendo, em condições ideais, graus de hidrólise de 18,31% com alcalase, 14,33% com papaína e 8,47% com tripsina (Wang & Zhang, 2012). Esses dados demonstram o potencial dos hidrolisados protéicos de *Chlorella pyrenoidosa* para aplicação em suplementos nutricionais.

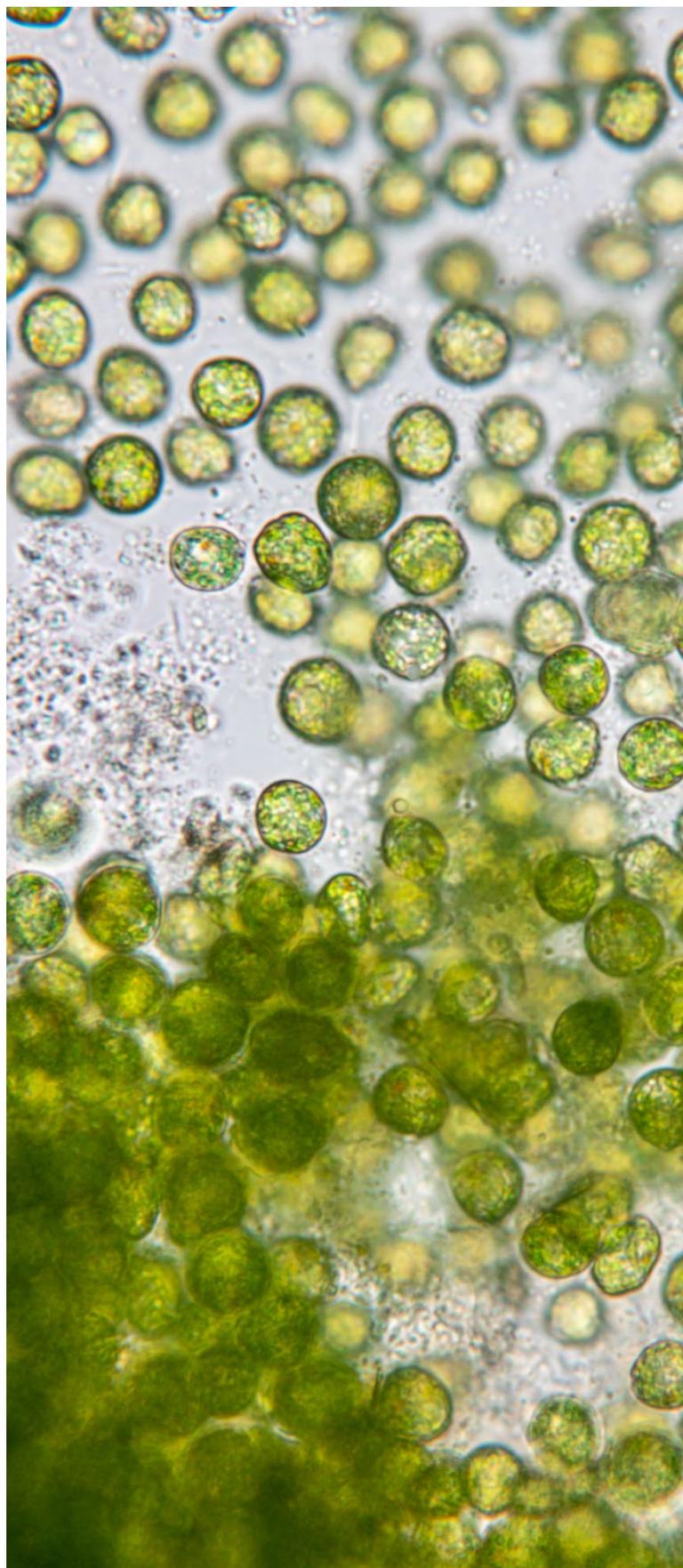


Imagem ilustrativa de algas do gênero *Chlorella*.
Fonte: Adobe Stock.

5. Fermentação de precisão



Almôndega de micoproteína com gordura obtida por fermentação de precisão. Crédito: Melt&Marble.

Ingredientes derivados da fermentação de precisão são amplamente usados na indústria de alimentos. A maioria das vitaminas em suplementos nutricionais e alimentos processados fortificados, como as vitaminas B12 e riboflavina, são produzidas por fermentação, assim como muitos componentes aromatizantes.

Uma das aplicações mais bem estabelecidas desse processo é a fabricação de enzimas alimentares, como a quimosina do coalho, por exemplo, usada na produção de queijos. A maioria das enzimas alimentares hoje também são predominantemente produzidas a partir de microrganismos recombinantes.

Este processo, já totalmente desenvolvido tecnologicamente para a produção de enzimas, passou a ser aplicado também na obtenção de outras proteínas de alto valor nutricional ou funcional para adição em análogos *plant-based* de produtos cárneos, lácteos e de ovos. Dentre os produtos já liberados pela FDA, há a leghemoglobina de soja produzida pela levedura *Pichia pastoris*, lançada pela empresa Impossible Foods para adição em hambúrguer vegetal. Essa proteína simula a função da mioglobina na conferência de cor, sabor e outros atributos da carne, produzindo um conjunto de propriedades organolépticas típicas no produto, sendo mais notáveis a cor, o sabor e suculência (*juiciness*) do produto frito ou grelhado (United States of America, 2018).

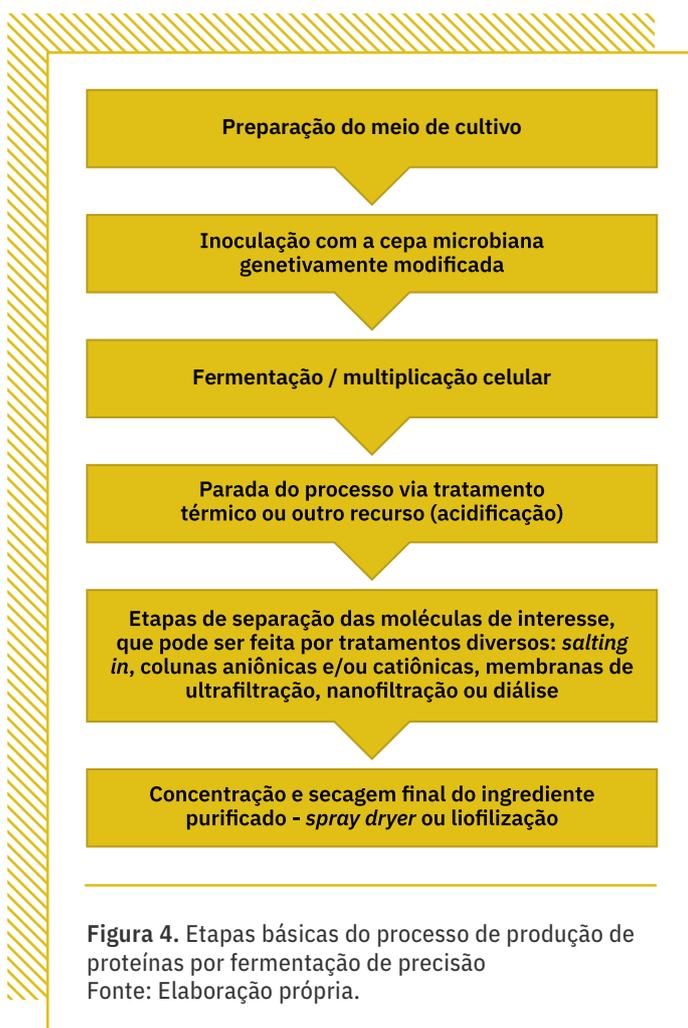


Gordura obtida por fermentação de precisão.
Crédito: Melt&Marble

Também já foi liberada a beta-lactoglobulina do soro de leite, produzida por *Trichoderma reesei* e lançada pela empresa Perfect Day, de Berkeley, Califórnia, para substituir a proteína do soro de leite tradicional e de outros alimentos (United States of America, 2020a). Duas outras proteínas encontram-se em fase de avaliação pela FDA. Uma é a ovomucóide (OVD) (glicoproteína localizada na clara do ovo de galinha), produzida por *Pichia pastoris* e fabricada pela empresa Clara Foods, de South San Francisco, Califórnia, para uso como fonte de proteína em alimentos convencionais, incluindo bebidas esportivas, suplementos proteicos em pó e barras de cereais (United States of America, 2021a). Outra é a mioglobina da carne bovina produzida por *Pichia pastoris*, fabricada pela empresa Motif Food Works, de Boston, Massachusetts, para uso em análogos de carne, como realçador de sabor e aroma (United States of America, 2021b).

A fermentação de precisão também é a principal fonte de fatores de crescimento substitutos dos de origem animal na produção de carne cultivada. Além disso, proteínas como o colágeno e fibronectina recombinantes podem servir como *scaffolding* para produtos mais complexos de carne cultivada (Ford et al., 2020).

Um fluxograma com as etapas básicas da produção de proteínas por fermentação de precisão é apresentado na Figura 4. Nessa figura não foram incluídas as etapas de modificação genética do microrganismo, mas várias tecnologias disponíveis podem ser encontradas no livro de Nevalainen (2020).



5.1. Microrganismos usados para a produção de novas proteínas por fermentação de precisão

Os microrganismos que têm sido utilizados na produção de proteínas de alto valor nutricional ou funcional para adição em análogos *plant-based* são os fungos filamentosos e as leveduras. As *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, por exemplo, são consideradas particularmente adequadas, pois apresentam a capacidade de produzir proteínas maiores do que 50 kDa, com alto rendimento e possibilidade de glicosilação. As leveduras também têm capacidade de produzir chaperoninas, proteínas que auxiliam no enovelamento de outras proteínas, incluindo aquelas ricas em ligações de dissulfeto. As propriedades funcionais das proteínas dependem da estrutura espacial resultante desse enovelamento e do dobramento do filamento protéico sobre si mesmo. Outra vantagem dos fungos é o fato de que esses microrganismos secretam apenas uma quantidade limitada de suas próprias proteínas secundárias no meio, facilitando as etapas subsequentes de purificação das proteínas recombinantes de interesse (Deckers, Deforce, Fraiture, & Roosens, 2020).

As bactérias são organismos hospedeiros simples e baratos, com muitos sistemas de expressão disponíveis para recombinação, mas, devido a problemas relacionados ao enovelamento, só podem produzir proteínas pequenas e simples (Deckers et al., 2020).

A produção de proteínas de interesse nutricional ainda é restrita para avaliar os microrganismos que poderão ser usados no futuro. No caso das enzimas, ao contrário, há um histórico muito mais longo de aplicação. Segundo Deckers et al. (2020), 50% dessas proteínas são produzidas por fungos, 35% por bactérias e as demais (15%) são derivadas de fontes animais ou vegetais. Na União Europeia, 50% das submissões para aprovação de enzimas envolvem apenas cinco espécies: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* (fungos filamentosos), *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (bactérias). Cabe destacar, entretanto, que apenas 43% de todos os dossiês apresentados usam cepas geneticamente modificadas. Dessas enzimas recombinantes, 63% são produzidas por fungos, e 37% por bactérias.

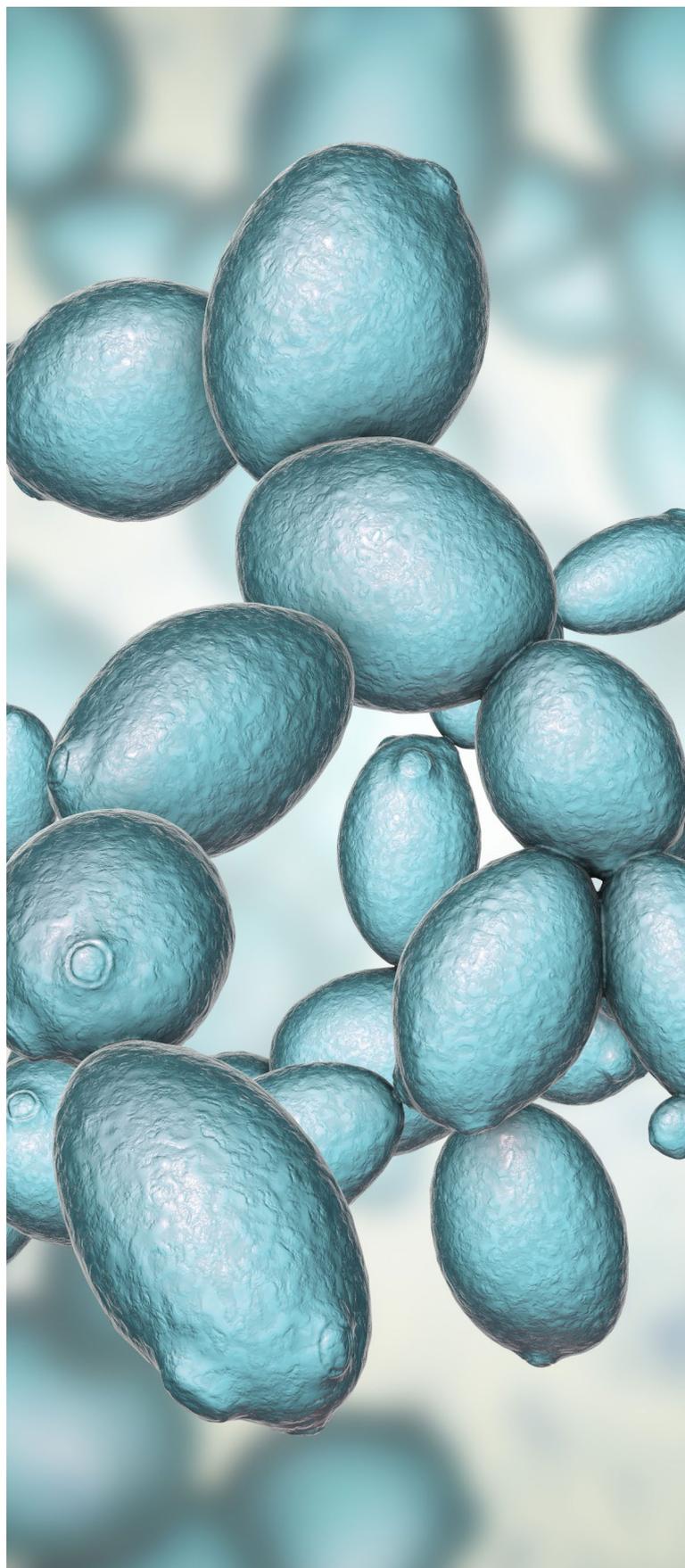


Ilustração 3D de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
Fonte: Adobe Stock.

Saiba mais

Para saber mais sobre fermentação e processos fermentativos, acesse:

[The science of fermentation](#)

[State of the industry report: fermentation](#)



Carne produzida com fermentação de biomassa.
Crédito: Meati Foods.

Referências

Amorim, G. M. (2011). *Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal* (Tese de Mestrado). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

Arnau, J., Yaver, D., & Hjort, C. M. (2020). Strategies and challenges for the development of industrial enzymes using fungal cell factories. In H. Nevalainen (Ed.), *Grand Challenges in fungal biotechnology* (pp. 179-210). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7>

Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation: Theory and practice*. Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>

Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M. A., & Roosens, N. H. C. (2020). Genetically modified microorganisms for industrial food enzyme production: An overview. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(3), 326. <https://doi.org/10.3390/foods9030326>

Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxins: Chemistry, genetics and biology*. APS Press.

Drouliscos, N. J., Macris, B. J., & Kokke, R. (1976). Growyh of *Fusarium moniliforme* on carob aqueous extract and nutritional evaluation of its biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(5), 691-694.

United States of America. U.S. Food & Drug Administration. (2018). GRAS Notice Inventory. FDA GRN No 737/2018. Recuperado de <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>

United States of America. U.S. Food & Drug Administration. (2020a). GRAS Notice Inventory. FDA GRN No 863/2020. Recuperado de <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>

United States of America. U.S. Food & Drug Administration. (2020b). GRAS Notice Inventory. FDA GRN N° 848/2020. Recuperado de <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>

United States of America. U.S. Food & Drug Administration. (2021a). GRAS Notice Inventory. FDA GRN No 967/2021. Recuperado de <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>

United States of America. U.S. Food & Drug Administration. (2021b). GRAS Notice Inventory. FDA GRN No 1001/2021. Recuperado de <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>

Ferraz, A. (2010). *Enzimologia*. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. http://www.debiq.eel.usp.br/aferraz/public_html/pagguiaE.htm

Finnigan, T. J. A., Needham, L., & Abbott, C. (2017). Mycoprotein: a healthy new protein with a low environmental impact. In S. Nadathur, J. Wanasundara, L. Scanlin (Eds.), *Sustainable protein sources* (pp. 305-325). Academic Press.

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., & Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9727-9732.

Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A., & Nielsen, K. F. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE*, 6(8), e23496.

Garibay, M.G., Ruiz, L.G., Cruz, A., & Bárzana, E. (2014). Single cell protein – Yeasts and bacteria. In C. Batt, P. Patel (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (2a ed., pp. 431-438). Elsevier.

Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2018). Production of protein-rich extracts from disrupted microalgae cells: Impact of solvent treatment and lyophilization. *Algal Research*, 36, 67-76.

Gutleb, A., Morrison, E., & Murk, A. J. (2002). Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(3-4), 309-320.

IARC (1993). Ochratoxin A. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 489-521.

King, R., Brown, N. A., Urban, M., & Hammond-Kosack, K. E. (2018). Inter-genome comparison of the Quorn fungus *Fusarium venenatum* and the closely related plant infecting pathogen *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*, 19(269),1-19.

Khor, G. L., Alexander, J. C., Lumsden, J. H., & Losos, G. J. (1977). Safety evaluation of *Aspergillus fumigatus* grown on cassava for use as an animal feed. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 41(4), 428-434.

Macris, B. J., & Kokke, R. (1978). Continuous fermentation to produce fungal protein. Effect of growth rate on the biomass yield and chemical composition of *Fusarium moniliforme*. *Biotechnology & Bioengineering*, 20, 1027-1035.

Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2000). Whole organisms biotechnology. In D. Moore, G. D. Robson, A. P. J. Trinci (Eds.), *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511977022.018>.

Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Byrant, C. M. (2006). Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, 71, R51-R65.

Nevalainen, H. (2020). *Grand challenges in fungal biotechnology*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7>.

Reade, A. E., & Gregory, K. F. (1975). High-temperature production of protein-enriched feed from cassava by fungi. *Applied Microbiology*, 30(6), 897-904.

Renge, V. C., Khedkar, S. V., & Nandurkar, N. R. (2012). Enzyme synthesis by fermentation method: A review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(4): 585-590. Recuperado de <https://www.tsijournals.com/articles/enzyme-synthesis-by-fermentation-method--a-review.pdf>

Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2017). Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2009. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>.

Ford, E., Ignaszewski, E., Oca, C. M., & Voss, S. (Eds.). (2020). *State of the Industry report: Fermentation*. Recuperado de <https://gfi.org/resource/fermentation-state-of-the-industry-report/>

Thrane, U. (2007). Fungal protein for food. In J. Dijksterhuis, R. A. Samson (Eds.), *Food mycology: A multifaceted approach to fungi and food* (Chapter 18). CRC Press.

Trinci, A. P. J. (1992). Myco-protein: A twenty-year overnight success story. *Mycological Research*, 96(1), 1-13.

Wang, X., & Zhang, X. (2012). Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. *Bioresource technology*, 126, 307-313.

The Good Food Institute Brasil

Alexandre Cabral	<i>Vice-presidente de Políticas Públicas</i>
Alysson Soares	<i>Especialista de Políticas Públicas</i>
Amanda Leitolis	<i>Especialista de Ciência e Tecnologia</i>
Ana Carolina Rossettini	<i>Gerente de Desenvolvimento</i>
Ana Paula Rossettini	<i>Analista de Recursos Humanos</i>
Camila Lupetti	<i>Especialista de Engajamento Corporativo</i>
Camila do Nascimento	<i>Analista de Finanças e Operações</i>
Cristiana Ambiel	<i>Gerente de Ciência e Tecnologia</i>
Fabio Cardoso	<i>Analista de Comunicação</i>
Guilherme de Oliveira Vilela	<i>Especialista de Engajamento Corporativo</i>
Gustavo Guadagnini	<i>Presidente</i>
Isabela Pereira	<i>Analista de Ciência e Tecnologia</i>
Jaqueline Gusmão	<i>Assistente Executiva</i>
Karine Seibel	<i>Gerente de Operações e Recursos Humanos</i>
Katherine de Matos	<i>Vice-presidente de Ciência e Tecnologia</i>
Lorena Pinho	<i>Analista de Ciência e Tecnologia</i>
Luciana Fontinelle	<i>Especialista de Ciência e Tecnologia</i>
Mariana Bernal	<i>Analista de Políticas Públicas</i>
Mariana Demarco	<i>Analista de Ciência e Tecnologia</i>
Raquel Casselli	<i>Diretora de Engajamento Corporativo</i>
Vinícius Gallon	<i>Especialista de Comunicação</i>

gfi / **Brasil**SM

 WWW.GFI.ORG.BR

 GFIBR@GFI.ORG

