

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

FERNANDA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE COLORANTES NATURAIS POR *Talaromyces amestolkiae*
PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

ARARAQUARA – SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

FERNANDA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE COLORANTES NATURAIS POR *Talaromyces amestolkiae*
PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

ARARAQUARA – SP

2020

O49p Oliveira, Fernanda de.
Produção de Colorantes Naturais por *Talaromyces amestolkiae* para
Aplicação Industrial / Fernanda de Oliveira. – Araraquara: [S.n.], 2020.
169 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita
Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.

1. *Talaromyces amestolkiae*. 2. Colorantes naturais. 3. Bioprocesso. 4.
Biorreatores. I. Ebinuma. Valéria de Carvalho Santos, orient. Título.

Dedico a todos que me apoiaram e auxiliaram durante todo o processo! Em especial, aos meus pais Soeli e Sebastião, que mesmo longe, me incentivaram e me apoiaram.

Aos meus pais **SOELI** e **SEBASTIÃO** por serem exemplos de coragem, por todo apoio incondicional e esforço para que meus sonhos fossem alcançados e principalmente à paciência e amizade durante este trajeto.

À orientadora Prof^a. Dr^a. **VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA**, por ter me dado a oportunidade de continuar trilhando meu caminho como cientista e por ter acreditado no meu potencial.

Aos professores **JOÃO A.P. COUTINHO** e **SÓNIA VENTURA**, por terem aberto seus laboratórios e me orientado em pontos cruciais do projeto durante o Doutorado Sanduíche na Universidade de Aveiro, Portugal.

Aos amigos de laboratório: vocês foram ótimos companheiros nesta jornada!

Aos docentes e funcionários do **DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA** pelo carinho e paciência durante o período de realização do trabalho.

À **FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS** por ter oportunizado essa conquista!

Ao **CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)**, pela importante contribuição financeira para a realização deste projeto.

À **CORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** pelo apoio financeiro durante o Doutorado Sanduíche na Universidade de Aveiro, Portugal.

“A satisfação está no esforço e não
apenas na realização final”

(Mahatma Gandhi)

Os colorantes naturais tornaram-se comercialmente importantes devido à menor toxicidade quando comparados aos colorantes sintéticos, à forte demanda dos consumidores por produtos mais naturais e à possível atividade biológica. Um dos requisitos cruciais para a introdução de colorantes naturais produzidos por microrganismos no mercado envolve a melhoria na produção, incluindo o desenvolvimento de cultivos reprodutíveis em biorreator. Diante disso, este trabalho objetivou produzir colorantes naturais por cultivo submerso de *Talaromyces amestolkiae*, em agitador rotativo e em biorreator tanque agitado em escala de bancada, e estudar a estabilidade desses compostos frente a diferentes valores de pH e presença de sais. Os estudos iniciais mostraram que em substituição às fontes complexas de nitrogênio (peptona de carne e extrato de carne), o glutamato monossódico (GMS) promoveu a produção de colorante vermelho solúvel sob baixo crescimento celular. Visando o aumento da produção, foram realizados ensaios em agitador rotativo avaliando diferentes variáveis (concentração de glicose, GMS, micronutrientes, pH e tamanho do inóculo). Verificou-se que o GMS e o pH desempenharam um papel importante na geração de condições de estresse, afetando o crescimento celular e a produção de colorantes, visto que a síntese de colorante parece ser desencadeada sob condições de estresse metabólico. Em condições ideais (g L^{-1}): glicose (10), GMS (25), MgSO_4 (0,012), FeSO_4 (0,01), CaCl_2 (0,015) e pH 5,0, um aumento de 30 vezes na produção em agitador rotativo foi alcançado, atingindo uma produção de colorante vermelho de 13,44 $\text{UA}_{500\text{nm}}$. A suplementação do meio GMS-glicose com diversas fontes de amina também foi estudada, porém não teve efeito significativo na produção. Assim, a passagem do cultivo em agitador rotativo para o biorreator tanque agitado foi avaliada. Na primeira etapa dos cultivos em biorreator variou-se a composição do meio do inóculo e a vazão de ar. Em seguida, o tipo de impelidor foi avaliado empregando uma estratégia de controle de vazão de ar. O melhor resultado de produção de colorante vermelho (28,7 $\text{UA}_{500\text{nm}}$) foi obtido sob aeração constante ($4,0 \text{ L min}^{-1}$) na frequência de agitação de 100 rpm pelos impelidores do tipo orelha de elefante, que representou um aumento de 2,05 vezes em relação às condições definidas em agitador rotativo. Nessa etapa foi verificado que a quantidade de biomassa inoculada, a morfologia do fungo, o tipo de impelidor empregado e o nível de oxigênio dissolvido são parâmetros fundamentais para que ocorra aumento na produção do colorante. O coeficiente de transferência de oxigênio volumétrico (k_La) do caldo de cultivo foi correlacionado com a morfologia celular, que variou de acordo com a geometria do impelidor e devido às condições de cisalhamento impostas às células do fungo. Paralelamente aos estudos de produção, avaliou-se a estabilidade dos colorantes vermelhos presentes no meio fermentado nos valores de pH entre 1,0 e 13 e na presença dos sais K_3PO_4 e MnSO_4 . Os colorantes vermelhos apresentaram estabilidade da cor na faixa de pH de 3,0 a 9,0 e não foram estáveis na presença dos sais K_3PO_4 e MnSO_4 . Ademais, os colorantes apresentaram instabilidade em termos de fluorescência após adição de ambos os sais. Esses resultados demonstram que a espécie *T. amestolkiae* tem grande potencial para produção de colorante em larga escala.

Palavras-chave: *Talaromyces amestolkiae*, colorantes naturais, bioprocesso, biorreatores.

Natural colorants have become commercially important due to their lower toxicity when compared to synthetic colorants, the strong consumer demand for more natural products and their possible biological activity. One of the crucial requirements for the introduction of natural colorants produced by microorganisms into the market involves improvements in production, including the development of reproducible bioreactor cultivations. Therefore, this work aimed to produce natural colorants by submerged cultivation of *Talaromyces amestolkiae*, in rotary agitator and in stirred tank bioreactor, and to study the stability of these compounds in different pH values and in the presence of salts. Initial studies have shown that in replacement of complex sources of nitrogen (meat peptone and meat extract), monosodium glutamate (MSG) promoted the production of soluble red colorant under low cell growth. In order to increase the red colorant production, tests were carried out on a rotary agitator evaluating different variables (glucose, MSG and micronutrients concentration, pH and inoculum size). It was found that MSG and pH played an important role in the generation of stress conditions, affecting cell growth and the production of colorants, since the colorant synthesis seems to be triggered under conditions of metabolic stress. Under ideal conditions (g L^{-1}): glucose (10), MSG (25), MgSO_4 (0.012), FeSO_4 (0.01), CaCl_2 (0.015) and pH 5.0, a 30-fold increase in rotary agitator production was achieved, reaching a red colorant production of 13.44 $\text{UA}_{500\text{nm}}$. Supplementation of the MSG-glucose medium with several amine sources has also been studied, however it had no significant effect on production. Thus, the scaling-up of the process, from rotary agitator to stirred tank bioreactor, was evaluated. In the first stage of cultivation in bioreactor, the composition of the inoculum medium and the air flow were evaluated. Then, the type of impeller was evaluated using an air flow control strategy. The best result of the production of red colorant (28.7 $\text{UA}_{500\text{nm}}$) was obtained under constant aeration (4.0 L min^{-1}) at the agitation frequency of 100 rpm by the elephant ear impeller type, which represented an increase of 2.05-fold in relation to the conditions defined in rotary agitator. In this stage it was verified that the quantity of inoculated biomass, the morphology of the fungus, the type of impeller employed, and the level of dissolved oxygen are fundamental parameters for an increase in the colorant production. The volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) of the cultivation broth was correlated with cell morphology, which varied according to the impeller geometry and due to the shear conditions imposed to the fungus cells. Parallel to the production studies, the stability of the red colorants present in the fermented medium was evaluated at pH values between 1.0 and 13 and in the presence of the K_3PO_4 and MnSO_4 salts. The red colorants showed color stability in the pH range of 3.0 to 9.0 and were not stable in the presence of K_3PO_4 and MnSO_4 salts. In addition, the colorants showed instability in terms of fluorescence after addition of both salts. These results demonstrate that the species *T. amestolkiae* has great potential for large-scale color production.

Keywords: *Talaromyces amestolkiae*, natural colorants, bioprocess, bioreactor.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Diagrama de representação do espaço de cores CIELAB ou CIELCH (coordenadas colorimétricas L^* , C^* e H^*): disposição tridimensional, mostrando as coordenadas L^* , a^* , b^* e C^* e H° . Croma (C^*) = $[(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ e ângulo de matiz (H°) = $\tan^{-1}(b^*/a^*)$. (Adaptado de Konica Minolta, 2019 em Autocad 2013)..... 32
- Figura 2.** Estrutura química e classificação de alguns colorantes naturais disponíveis para comercialização. (Adaptado de Sigurdson; Tang; Giusti, 2017)..... 36
- Figura 3.** Colorantes produzidos por fungos dos gêneros *Monascus*, *Talaromyces*, *Penicillium* e *Aspergillus*. **(A)** Estrutura das azafilonas evidenciando o núcleo bicíclico altamente oxigenado, que constitui o cromóforo dos colorantes de *Monascus*. **(B)** Resumo da rota de biossíntese do β -cetoácido pela FAS (Ácido graxo sintase). **(C)** Possível rota biossintética das azafilonas coloridas envolvendo a ação da PKS (Policetídeo sintase) e FAS na esterificação de um cromóforo de azafilona e um β -cetoácido (Adaptado de Hajjaj *et al.*, 1997) 40
- Figura 4.** Aspecto morfológico de *T. amestolkiae*. **(A)** e **(B)** Aspecto macroscópico de *T. amestolkiae* em placa de Petri contendo BDA-YE (frente e verso) e apresentando excreção dos colorantes para o meio. **(C)** e **(D)** Microscopia de campo claro do *T. amestolkiae* caracterizando os conidióforos e as hifas. Colônias incubadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA-YE a 30 °C por 7 dias (Ampliação de 100X). (Fonte: Autoria própria)..... 44
- Figura 5.** Representação esquemática da reação aminofílica entre os colorantes laranjas (monascorubrina ou rubropunctatina, $R = C_5H_{11}$ ou C_7H_{15}) de *Monascus anka* e o GMS, a qual pode ocorrer no interior das células durante o cultivo submerso e desencadeia a excreção no meio de cultivo dos colorantes vermelhos (N-gutarilmonascorubramina ou N-glutarilrubropunctamina, $R = C_{28}H_{33}NO_8$ ou $C_{26}H_{29}NO_8$) solúveis em água, apresentando o resíduo GMS (seta pontilhada). (Adaptado de Xiong *et al.*, 2015). 48
- Figura 6.** **(A)** Linhas de corrente para escoamento radial produzidas por impelidor do tipo turbina Rushton. **(B)** Linhas de corrente mistas para escoamento radial e axial produzidas por impelidor do tipo orelha de elefante. (Adaptado de Holland; Bragg, 1995). 55

Figura 7. Fluxograma representando a condução dos experimentos para a produção de colorantes naturais por <i>T. amestolkiae</i>	60
Figura 8. Biorreator Minifors II (INFORS, New Jersey/USA) e impelidores empregados nos cultivos de aumento de escala para produção de colorantes naturais por <i>T. amestolkiae</i>	66
Figura 9. Diagrama esquemático dos ensaios de avaliação da produção de colorantes naturais por <i>T. amestolkiae</i> em biorreator tanque agitado.....	67
Figura 10. Produção de corante vermelho (▲), biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a fermentação de <i>T. amestolkiae</i> em agitador rotativo utilizando glicose e GMS. Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança	78
Figura 11. (A) Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 , (B) planejamento fatorial 2^2 , (C) planejamento Plackett-Burman para o estudo da produção de corante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> em agitador rotativo. A linha no gráfico representa uma linha de referência, qualquer fator que ultrapasse essa linha tem efeito significativo no valor de $p < 0,05$	82
Figura 12. Apresentação esquemática da condição experimental empregada e da respectiva produção de colorantes naturais vermelhos obtidos por cultivo submerso de <i>T. amestolkiae</i>	89
Figura 13. Classificação das cores no espaço CIELAB para as melhores condições testadas, em termos de produção de corante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> . Os ângulos de matiz e croma estão associados aos valores L^* variando de 13 a 87.....	91
Figura 14. Espectros 3D de excitação e emissão de fluorescência do meio fermentado na (A) ausência de $MgSO_4$, $FeSO_4$, KCl , $CuSO_4$, $CaCl_2$ e (B) presença dos sais. Três regiões distintas de fluorescência foram identificadas (A) I (λ_{ex} 258 nm, λ_{em} 434 nm, Intensidade de fluorescência = 313920 UF), II (λ_{ex} 316 nm, λ_{em} 432 nm, I = 150000 UF) and III (λ_{ex} 476 nm, λ_{em} 520 nm, I = 133400 UF); (B) I (λ_{ex} 258 nm, λ_{em} 434 nm, I = 94800 UF), II (λ_{ex} 314 nm, λ_{em} 426 nm, I = 54600 UF) e III (λ_{ex} 480 nm, λ_{em} 520 nm, I = 258360 UF)	93
Figura 15. Mudança qualitativa de cor no espaço de cor CIELAB para os colorantes produzidos por <i>T. amestolkiae</i> em todas as condições de suplementação estudadas. Croma $C^* = \sqrt{(a^2/b^2)}$. Ângulo de matiz (H°) = $\tan^{-1}(b^*/a^*)$. L^* indica luminosidade para 0 (preto) a 100 (branco). O valor positivo a^*	

indica a cor vermelha, enquanto o valor negativo a^* representa a cor verde. Da mesma forma, os valores b^* positivos e negativos indicam as cores amarela e azul, respectivamente. Os valores de croma denotam a saturação ou pureza da cor. Os valores do ângulo de matiz representam o grau de vermelhidão, amarelo, verde e azul; o máximo é 0, 90, 180 e 270, respectivamente 100

Figura 16. (A) Crescimento do fungo *T. amestolkiae* em meio GMS-glicose e **(B)** meio complexo, e suas respectivas estruturas macromorfológicas. Observação por microscopia de campo claro em ampliação de 100X. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e 150 rpm em agitador rotativo. Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança..... 103

Figura 17. Cultivos do fungo *T. amestolkiae* em biorreator tanque agitado empregando **(A)** inóculo de composição GMS-glicose para vazão de ar de 2,0 Lmin⁻¹ e **(B)** 8,0 Lmin⁻¹; e **(C)** inóculo de composição complexa e taxa de aeração de 8,0 Lmin⁻¹ e suas respectivas estruturas macromorfológicas. Observação por microscopia de campo claro e ampliação de 100X. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e frequência de agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança..... 109

Figura 18. Determinação da saturação do oxigênio dissolvido para os dois tipos de impelidores: **(A)** orelha de elefante e **(B)** turbina Rushton a 100 rpm, 30 °C em diferentes vazões de ar empregando o meio de cultivo GMS-glicose sem o microrganismo. **(C)** Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) do meio GMS-glicose sem o microrganismo (k_{La} referência) em função da vazão de ar, calculado a partir dos dados obtidos pelo método dinâmico 114

Figura 19. Cultivos em biorreator tanque agitado para os experimentos de controle de aeração em cascata empregando as turbinas Rushton. **(A)** Nível de OD definido em 20 % de saturação de ar; **(B)** nível de OD definido em 50 % de saturação de ar; **(C)** nível de OD definido em 100 % de saturação de ar. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança..... 119

Figura 20. Cultivo em biorreator tanque agitado empregando os impelidores tipo orelha de elefante em controle de aeração em cascata com nível OD definido em 100 % de saturação de ar. O experimento foi realizado a 30 °C e frequência de

agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança	122
Figura 21. Cultivos em biorreator tanque agitado para aeração constante a 4,0 Lmin ⁻¹ ; (A) experimentos empregando as turbinas Rushton e (B) impelidores tipo orelha de elefante, e sua observação de estruturas macromorfológicas por microscopia de campo claro, respectivamente. Ampliação de 100x. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e uma frequência de agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.....	125
Figura 22. Estabilidade do colorante vermelho do meio fermentado ao longo do tempo. O pH foi alterado pela adição de HCl (1,0 M) ou NaOH (1,0 M). As amostras foram retiradas após 0, 1, 2, 3, 12 e 24 h de incubação a 25 °C. O meio fermentado, pH 5,0, foi considerado como controle dos ensaios e representa 100 % de absorbância em 500 nm ao longo do tempo. As barras de erro representam limites de confiança de 95 % para cada medida.	131
Figura 23. Propriedades espectroscópicas do meio fermentado de <i>T. amestolkiae</i> sob adição de HCl (1,0 M) e NaOH (1,0 M) após 24 h de incubação a 25 °C. O fator de diluição foi levado em consideração	132
Figura 24. Mudança de cor no espaço de cores CIELAB para os colorantes produzidos por <i>T. amestolkiae</i> de todas as condições testadas após 24 h de incubação a 25 °C, mostrando os ângulos de matiz e croma nos valores L* de 0,13 a 50,47	135
Figura 25. Propriedades espectroscópicas do meio fermentado de <i>T. amestolkiae</i> sob adição de K ₃ PO ₄ e MnSO ₄ (ambos 15 e 30 % m/m) após 24 h de incubação a 25 °C. O fator de diluição foi levado em consideração.....	139
Figura 26. Representação do possível ataque do sal K ₃ PO ₄ à molécula do colorante vermelho produzido por <i>T. amestolkiae</i> , e mudança de cor no espaço de cores CIELAB para os colorantes produzidos por <i>T. amestolkiae</i> após adição de sais ao meio fermentado após 24 h de incubação a 25 °C	140

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variáveis e níveis dos fatores usados nos planejamentos experimentais empregados para o estudo da produção de corante vermelho por cultivo submerso de <i>T. amestolkiae</i> em agitador rotativo a 30 °C, 150 rpm por 168 h.....	63
Tabela 2. Variáveis e níveis dos fatores usados no planejamento Plackett-Burman empregado para o estudo da produção de corante vermelho por cultivo submerso de <i>T. amestolkiae</i> em agitador rotativo a 30 °C, 150 rpm por 168 h.....	64
Tabela 3. Avaliação da fonte de nitrogênio para o estudo da produção de corantes amarelo, laranja e vermelho por <i>T. amestolkiae</i> , consumo de glicose, biomassa e pH final. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.....	76
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para o estudo da produção de corante vermelho por cultivo submerso de <i>T. amestolkiae</i> . Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo	80
Tabela 5. Matriz do planejamento central composto 2 ² para o estudo da produção de corante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> . A concentração de glicose utilizada para estes cultivos foi de 10,0 gL ⁻¹ e variou-se o pH inicial e a concentração de GMS. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.	83
Tabela 6. Avaliação do tamanho do inóculo na produção de corante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> . Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.....	85
Tabela 7. Planejamento Plackett-Burman empregado na produção de corante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> . Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.....	87
Tabela 8. Avaliação da concentração de MgSO ₄ na produção de corante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> . Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.....	88
Tabela 9. Influência dos aditivos na suplementação do meio GMS-glicose na produção do corante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> em 30 °C e 150 rpm em agitador rotativo por 168 h.....	96

Tabela 10. Cultivos em biorreator tanque agitado para produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* a 30 °C e 100 rpm. Valores obtidos ao final do cultivo (120 h)..... 107

Tabela 11. Cultivos em biorreator tanque agitado para produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* a 30 °C e 100 rpm. Valores obtidos ao final do cultivo (168 h)..... 117

Lista de Material Suplementar

Figuras

Figura S1. Espectro de absorbância dos colorantes produzidos por <i>T. amestolkiae</i> em agitador rotativo utilizando o meio GMS-glicose e 15 discos de micélio.....	161
Figura S2. Cultivo em biorreator tanque agitado empregando as turbinas Rushton em modo de aeração em cascata com nível OD fixado em 100 % de saturação de ar. O experimento foi realizado a 30 °C e uma velocidade de agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.....	162

Tabelas

Tabela S1. Valores colorimétricos para todas as condições testadas na produção de colorantes por <i>T. amestolkiae</i> em agitador rotativo a 30 °C e 150 rpm de agitação.....	163
Tabela S2. Cultivo em biorreator tanque agitado empregando as turbinas Rushton para produção de colorante vermelho por <i>T. amestolkiae</i> a 30 °C e 100 rpm. Valores obtidos ao final do cultivo (168 h).....	164
Tabela S3. Estabilidade do colorante vermelho de <i>T. amestolkiae</i> , pH inicial de 5,0, em diferentes valores de pH e na presença de sais.....	165

Abreviatura e Siglas

Abs – Absorbância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDA – Batata Dextrose Ágar

BDA-YE – Batata Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura

CIE – *Commission Internationale de L'Eclairage*

CIELAB – Coordenadas colorimétricas L*, a* e b*

CIELCH – Coordenadas colorimétricas L*, C* e H*

CYA – Agar Czapeck

C₅H₁₁ – Monascorubrina

C₇H₁₅ – Rubropunctatina

C₂₈H₃₃NO₈ – N-gutarilmonascorubramina

C₂₆H₂₉NO₈ – N-glutarilrubropunctamina

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CuSO₄ – Sulfato de cobre

EFSA – *European Food Standards Authority*

FAS – Ácido graxo sintase

FDA – *Food and Drug Administration*

FeSO₄ – Sulfato de ferro (II)

GABA – 4-aminobutirato

GMS – Glutamato monossódico

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

K₃PO₄ – Fosfato tripotássico

KCl – Cloreto de potássio

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MnSO₄ – Sulfato de manganês

NaOH – Hidróxido de sódio

NH₃⁺ – Íon amônia

NMI – *Natural Marketing Institute*

OD – Oxigênio dissolvido

OMS – Organização Mundial da Saúde

O₂ – Oxigênio

PKS – Policetídeo sintase

TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico

UA – Unidades de absorbância

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

V – Volume

V/A – Relação colorante vermelho e amarelo

V/L – Relação colorante vermelho e laranja

RID – Detector de índice refrativo diferencial

ZnSO₄ – Sulfato de zinco

Símbolos

% – Porcentagem

% (m/m) – Porcentagem massa por massa

% (m/v) – Porcentagem massa por volume

% (v/v) – Porcentagem volume por volume

K – Índice de consistência

n – Índice de comportamento de escoamento

η_a – Viscosidade aparente

λ_{ex} – Comprimento de onda de excitação

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão

μL – Microlitros

μm – Micrometro

T – Tensão de cisalhamento

γ – Taxa de cisalhamento

A – Amperes

a^* – Vermelho e verde

$\arctan$ – Arco tangente

b^* – Amarelo e azul

C – Concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida

C^* – Croma

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

cell^{-1} – Células por litro

cm – Centímetros

cP – Centipoise

C_s – Concentração de oxigênio no líquido que está em equilíbrio com o teor de oxigênio na fase gasosa

F – Teste Fisher

g – Gramas

gL^{-1} – Gramas por litro

gm^2 – Gramas por metro ao quadrado

h – Horas

H^* – Ângulo de matiz

k_L – Coeficiente de transferência de massa

k_{La} – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

L – Litros

L* – Luminosidade

Lmin⁻¹ – Litros por minuto

M – Molar

mg – Miligramas

mgL⁻¹ – Miligramas por litro

min – Minuto

mL – Mililitro

mLmin⁻¹ – Mililitros por minuto

mm – Milímetro

mmol – Milimolar

molL⁻¹ – Molar por litro

mmolL⁻¹ – Milimolar por litro

nm – Nanômetro

p – Probabilidade de significância

R² – Coeficiente de determinação

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

t – Teste Tukey

tan⁻¹ – Função inversa da tangente

UA – Unidades de absorbância

UF – Unidades de fluorescência

vvm – Volume de ar por volume de meio, por minuto

X – Concentração celular

X_i – Variável independente

Sumário

1.Introdução	27
2. Revisão da Literatura	31
2.1 Cor	32
2.2 Colorantes naturais	33
2.3 Colorantes naturais de origem microbiológica	38
2.4 <i>Talaromyces amestolkiae</i>	42
2.5 Cultivo submerso	45
2.5.1 Parâmetros que afetam a produção de colorantes	45
2.5.2 Aumento de escala	50
2.5.2.1 Agitação e aeração em cultivo submerso	51
3. Objetivos	57
3.1 Objetivo Geral	58
3.2 Objetivos Específicos	58
4. Materiais e Métodos	59
4.1 Materiais	61
4.2 Microrganismos e preparação do inóculo	61
4.3 Produção de colorantes em agitador rotativo	62
4.3.1 Avaliação da fonte de nitrogênio	62
4.3.2 Planejamentos estatísticos	62
4.3.3 Suplementação do meio GMS-glicose	64
4.3.4 Avaliação do crescimento do microrganismo e reologia do caldo de cultivo	65
4.4 Cultivos em biorreator tanque agitado	65
4.5 Estudo de estabilidade da cor em diferentes valores de pH e na presença de sais	69
4.6 Métodos analíticos	70
4.6.1 Análise colorimétrica	71
4.6.2 Análise de fluorescência	71
4.6.3 Estudo da reologia do caldo de fermentação e microscopia	72
4.6.4 Estudo hidrodinâmico	72
5. Resultados e Discussão	74
5.1 Produção de colorantes em agitador rotativo	75
5.1.1 Avaliação da fonte de nitrogênio	75

5.1.2 Planejamentos fatoriais	79
5.1.3 Efeito do número de discos de micélio inoculados.....	85
5.1.4 Efeito da adição de micronutrientes	86
5.2 Análise colorimétrica	89
5.3 Análise de fluorescência	92
5.4 Suplementação do meio GMS-glicose.....	94
5.4.1 Características dos colorantes derivados da suplementação do meio GMS-glicose	99
5.5 Estudo do crescimento do microrganismo em diferente fontes nutricionais..	101
5.6 Cultivos em biorreator tanque agitado	106
5.6.1 Avaliação da composição do meio do inóculo.....	106
5.6.2 Caracterização da capacidade de transferência de oxigênio dos impelidores	114
5.6.3 Experimentos em aeração em cascata	116
5.6.4 Experimentos em aeração constante	124
5.7 Estudos de estabilidade.....	130
5.7.1 Mudança de cor por ação de ácido e base	130
5.7.2 Mudança de cor por ação de sais	138
7. Conclusões	142
8. Bibliografia.....	145
9. Material Suplementar	160
10. Artigos	166

Introdução

Considerada atributo essencial da estética de um produto, a cor é frequentemente modificada ou ressaltada pela adição de aditivos, contribuindo com a sua receptividade pelo consumidor (BOO *et al.*, 2012; VINHA *et al.*, 2018). Tais aditivos, denominados colorantes, podem ser classificados de acordo com a sua origem como sintéticos ou naturais. Em relação aos colorantes sintéticos, um número crescente de publicações científicas tem relacionado o uso de colorantes sintéticos à toxicidade ambiental e preocupações com a saúde (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015; VENDRUSCOLO *et al.*, 2016a).

Em contrapartida, os colorantes naturais têm sido cada vez mais utilizados pela indústria farmacêutica e de alimentos devido às suas propriedades menos tóxicas e possível valor medicinal (NARSING RAO; XIAO; LI, 2017; WROLSTAD; CULVER, 2012). Entre esses, os tons vermelhos são amplamente empregados na indústria de alimentos, devido, principalmente, à sua distribuição predominante em frutas e vegetais e sua capacidade de estimular o apetite (SINGH, 2006). Os colorantes vermelhos estão presentes em muitos alimentos, incluindo bebidas, confeitados, laticínios, carnes, salgadinhos e cereais. No entanto, obter um aditivo que transmita aos alimentos um tom vermelho vibrante é um desafio (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017).

Entre as fontes naturais de produção de colorantes, pode-se citar as fontes convencionais (plantas e insetos) e os colorantes obtidos por via biotecnológica (microrganismos) (BOO *et al.*, 2012). A maioria dos colorantes naturais atualmente disponíveis no mercado são obtidos de fontes vegetais e animais. Porém, esses aditivos têm inúmeros inconvenientes, tais como instabilidade, alto custo e muitas vezes não estão disponíveis durante todo o ano (GHIDOUCHE *et al.*, 2013). Além disso, geralmente, os colorantes oriundos de plantas e insetos são mais sensíveis ao calor, luz e oxigênio que os colorantes sintéticos, resultando em perda de cor ou alterações na tonalidade. Outros podem ser sensíveis às condições da matriz de aplicação, como pH, presença de proteínas, íons metálicos e outros compostos orgânicos (LAKSHMI, 2014; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

Para os colorantes naturais serem comercializados deve-se conhecer a estabilidade da molécula na matriz de aplicação, o rendimento e o preço final após a purificação da mesma (WISSGOTT; BORTLIK, 1996). Além disso, os

colorantes usados na indústria alimentícia são regulamentados. Os requisitos de segurança e regulamentação variam entre os diferentes países e áreas geográficas (TORREGROSA-CRESPO *et al.*, 2018). Organizações como a FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, a EFSA (*European Food Standards Authority*) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) têm defendido dosagens seguras para o uso desses compostos em alimentos, medicamentos e itens cosméticos (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015; GALAFFU; BORTLIK; MICHEL, 2015).

As substâncias de origem microbiana, sobretudo as fúngicas, sobressaem-se sobre as oriundas de outras fontes naturais pelas facilidades em termos de produtividade e melhor compatibilidade com processos industriais, pois não estão sujeitas à sazonalidade e podem ser produzidas ininterruptamente, com rendimentos previsíveis e otimizáveis (ABEROUMAND, 2011). O fungo *Monascus* tem sido alvo de muitos estudos para a produção de colorantes. No entanto, juntamente com o colorante o microrganismo produz micotoxinas que impedem sua aplicação como colorante na indústria alimentícia em diversos países devido à legislação vigente (CARO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2015a). Linhagens do gênero *Talaromyces* produzem colorantes estruturalmente semelhantes aos de *Monascus* e têm sido cada vez mais estudadas (ISBRANDT *et al.*, 2019; ZACCARIM *et al.*, 2018). A produção de colorantes por microrganismos ocorre durante o processo fermentativo e é influenciada pela composição do meio de cultivo, pH, oxigenação do caldo de cultivo, frequência de agitação e outros fatores (KANG *et al.*, 2014; LIN; DEMAIN, 1991).

As vantagens da produção de colorantes via microrganismos incluem maior facilidade de extração e maiores rendimentos, além da possibilidade de produção em pequenos espaços e em larga escala (ABEROUMAND, 2011). Um dos desafios de se trabalhar com microrganismos filamentosos, como o *Talaromyces amestolkiae*, em cultivo submerso em biorreator é o controle do crescimento e morfologia do microrganismo, que podem gerar problemas de transferência de massa e energia dentro do biorreator (CORRÊIA GOMES; TAKAHASHI, 2016).

As propriedades reológicas (particularmente a viscosidade aparente) do caldo de cultivo dependem tanto da concentração celular quanto da morfologia do microrganismo (CAIRNS *et al.*, 2019; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG,

2018). Quando os fungos crescem na forma de *pellets*, o caldo de cultivo apresenta baixa viscosidade (LIN; SCHOLZ; KRULL, 2010; PAPAGIANNI, 2004). Por outro lado, quando o crescimento é de micélio filamentosos, a viscosidade do caldo é elevada, o que pode reduzir drasticamente a capacidade de transferência de oxigênio e mistura de nutrientes dentro do biorreator (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Portanto, o controle do crescimento e da morfologia do micélio na fermentação submersa é muitas vezes um pré-requisito para a aplicação industrial (CORRÊIA GOMES; TAKAHASHI, 2016; LV *et al.*, 2017).

Devido às variadas morfologias que os fungos podem apresentar em cultivos submersos, as variáveis hidrodinâmicas afetam significativamente a morfologia celular através das condições de cisalhamento impostas às células fúngicas (LIN; SCHOLZ; KRULL, 2010; YU *et al.*, 2012). Dessa maneira, a seleção de um impelidor eficiente pode determinar as condições de cisalhamento impostas ao microrganismo, influenciando assim na eficiência de crescimento ou formação de produtos e possivelmente alterando a morfologia fúngica (ZHONG, 2010). Encontrar a melhor forma de condução do processo e definir as concentrações dos nutrientes são fatores que contribuem para a redução do custo de produção e aumento da produtividade da molécula de interesse. Além disso, as possíveis propriedades terapêuticas e estabilidade em relação ao pH são características interessantes que promovem o uso de colorantes provenientes de *T. amestolkiae* como substitutos para colorantes sintéticos (SANTOS-EBINUMA; TEIXEIRA; PESSOA, 2013; ZACCARIM *et al.*, 2018).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* em cultivo submerso (em agitador rotativo e em biorreator tanque agitado) e analisar as propriedades halocrômicas dos colorantes produzidos, que é a capacidade de mudar de coloração em função do pH. O efeito do pH no perfil dos colorantes foi examinado com base nas suas características de cor e fluorescência.

Revisão da Literatura

2.1 Cor

Considerando alimentos e bebidas, a cor é um dos atributos sensoriais mais importantes do produto às nossas expectativas de sabor e aroma (VINHA *et al.*, 2018). A cor é o resultado produzido no cérebro pelo estímulo recebido quando a energia radiante penetra nos olhos, permitindo a distinção do verde, do azul, do vermelho e de outras cores. As cores são muito empregadas na indústria alimentícia pela inserção de aditivos, os chamados colorantes, para restituir a aparência original, tornar o alimento visualmente mais atraente, conferir coloração aos desprovidos de cor e reforçar as cores presentes nos alimentos (BOO *et al.*, 2012; WIBOWO *et al.*, 2015).

Vários sistemas são utilizados para expressar numericamente a cor. A Comissão Internacional de Iluminação (CIE – *Commission Internationale de L'Eclairage*) desenvolveu padrões que permitem definir a cor de acordo com o espaço psicométrico CIELAB (coordenadas colorimétricas L^* , a^* e b^*). Na **Figura 1** está representado o diagrama CIELAB.

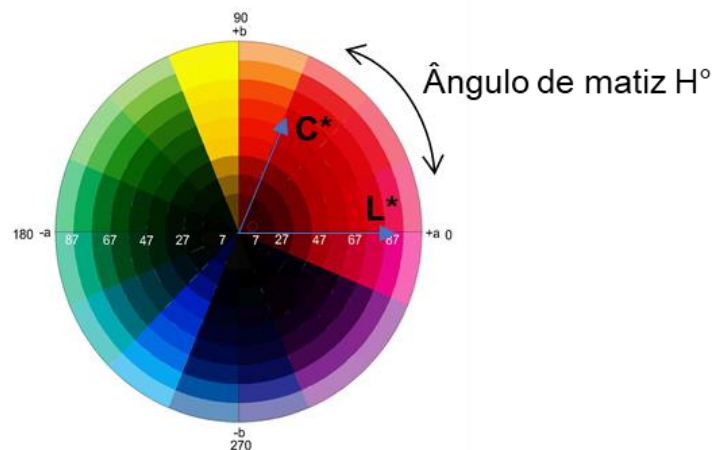


Figura 1. Diagrama de representação do espaço de cores CIELAB ou CIELCH (coordenadas colorimétricas L^* , C^* e H°): disposição tridimensional, mostrando as coordenadas L^* , a^* , b^* e C^* e H° . Croma (C^*) = $[(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ e ângulo de matiz (H°) = $\arctan(b^*/a^*)$. (Adaptado de Konica Minolta, 2019 em Autocad 2013).

Neste espaço de cores uma cor específica é descrita como um ponto no espaço tridimensional matiz-luminosidade-croma, o que é compreendido de forma mais intuitiva pelo cérebro. L^* indica luminosidade de 0 (preto) a 100 (branco). Positivos e negativos em a^* representam vermelho e verde, respectivamente, enquanto positivos e negativos em b^* representam amarelo e

azul, respectivamente. Valores de croma (C^*) denotam a saturação ou pureza da cor. Valores próximos ao centro com o mesmo valor L^* indicam cores opacas ou cinza, enquanto valores próximos ao raio da circunferência representam cores vivas ou brilhantes. Os valores do ângulo de matiz (H°) é o ângulo formado entre a^* e b^* e representa 0 para vermelho, 90 para amarelo, 180 para verde e 270 para azul (KONICA MINOLTA, 2020). Essa análise de cor é fundamental para estabelecer as características de cor de um colorante seja esse sintético ou natural.

2.2 Colorantes naturais

As substâncias usadas para mudar a cor de um material, uma superfície ou uma solução são chamadas de colorantes e podem ser classificados como pigmentos ou corantes. Os colorantes podem ser classificados quanto à sua origem – sintéticos ou naturais ou quanto à sua solubilidade – pigmentos ou corantes. Em geral, os corantes apresentam solubilidade no meio aplicado, ao passo que pigmentos são moléculas insolúveis. Enquanto os corantes não acarretam modificações físico-químicas na matriz a qual são aplicados, os pigmentos geram modificações (SARON; FELISBERTI, 2006). Além disso, os pigmentos e corantes diferem apenas por características físicas e não por características químicas. Assim, um colorante pode ser um corante ou um pigmento dependendo da matriz a qual é aplicado, ou seja, carotenoides são corantes em óleo e pigmentos em água (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2003).

O mercado de colorantes industriais é composto majoritariamente por colorantes sintéticos/ não renováveis. Os colorantes azóicos, uma classe de cores sintéticas comuns, são derivados de produtos petroquímicos e têm a vantagem de proporcionar uma elevada intensidade de coloração, tonalidades atraentes e boa estabilidade (DOWNHAM; COLLINS, 2000; SCOTTER, 2011). No entanto, um número crescente de publicações científicas tem relacionado os colorantes sintéticos com efeitos adversos, tais como toxicidade ambiental, carcinogenicidade e alergenicidade, além de serem derivados do petróleo e causadores do efeito estufa (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015; VENDRUSCOLO *et al.*, 2016a). No Brasil, o controle do uso de colorantes sintéticos como aditivos alimentares é regulamentado pela Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA), resoluções nº 382 e 388 de 9 de agosto de 1999, e apenas 11 colorantes sintéticos são permitidos (amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina, vermelho de eritrosina, vermelho 40, amaranto, ponceau 4R, azul indigotina, azul brilhante, azul patente V, azorrubina, verde rápido), sendo que as normas brasileiras para colorantes e aditivos são baseadas nas normas americanas especificadas pelo FDA e normas européias do EFSA (PRADO; GODOY, 2003). Nesse sentido, os colorantes naturais representam uma alternativa emergente para a indústria.

As fontes naturais de colorantes são geralmente plantas, insetos e microrganismos, sendo esse último de grande interesse (DE MEJIA *et al.*, 2020). Os colorantes naturais são reconhecidos como mais seguros ao ser humano e biodegradáveis, por não oferecerem riscos à saúde humana e ao meio ambiente (WROLSTAD; CULVER, 2012). Os colorantes naturais podem ser usados como aditivos, antioxidantes ou intensificadores de cor em diversos segmentos industriais, incluindo cosméticos, fármacos, têxteis e como ingredientes funcionais de alimentos e bebidas (NARSING RAO; XIAO; LI, 2017). Entre essas aplicações, alimentos e bebidas respondem pela maior participação de uso de colorantes naturais (MARKET INSIGHTS, 2020).

A substituição de compostos sintéticos em produtos alimentícios por alternativas naturais tem sido impulsionada por consumidores dispostos a pagar mais por produtos mais saudáveis. Nos Estados Unidos da América, o instituto *Natural Marketing Institute* (NMI) fez um estudo (2017 Health & Wellness Trends in America) descrevendo a abordagem dos consumidores modernos para a saúde e bem-estar (MARKET RESEARCH, 2020). Os dados mostraram que nos tempos atuais, a preocupação dos consumidores com ingredientes artificiais em alimentos e bebidas mais que dobrou. Além disso, nos últimos dez anos o interesse de compra aumentou em cerca de 30 % para marcas que utilizam colorantes naturais. Segundo estimativa da Grand View Research de 2020, o mercado mundial de cores para 2023 pode atingir US\$ 1620 milhões. Especificamente, para o mercado de alimentos, o consumo de colorantes naturais pode registrar nos próximos cinco anos um crescimento anual de 5,4 % (GLOBAL INFO RESEARCH, 2020).

A substituição de colorantes sintéticos por seus análogos naturais é um grande desafio para as indústrias alimentícia e farmacêutica, tanto do ponto de

vista técnico quanto por razões de custo dos ingredientes. Para um colorante ser comercializado como aditivo alimentar, ele deve ter as seguintes qualidades: (i) inocuidade, (ii) estabilidade, (iii) compatibilidade e solubilidade, e (iv) aplicabilidade. Os colorantes alimentares devem ser atóxicos e biodegradáveis, não rendendo riscos aos seres humanos, aos animais ou ao meio ambiente (WROLSTAD; CULVER, 2012). Ou seja, não devem ter efeitos adversos e devem apresentar estabilidade química e alta tolerância ao pH, ao calor e à luz. Para que os colorantes sejam aplicáveis, eles devem ser capazes de melhorar a aparência e outras características organolépticas dos alimentos, ser inativos com outros componentes dos alimentos e demonstrarem aceitabilidade geral, pois devem ser insípidos e inodoros (MAPARI *et al.*, 2005). Some-se a isso o fato de que para competir com os colorantes sintéticos, os naturais devem ter um impacto mínimo no preço final do produto.

Dentre as estruturas diversificadas e variedade de fontes, os colorantes naturais podem ser agrupados em algumas classes: flavonoides, derivados de isoprenóides, derivados de pirroles e derivados de indol. Na **Figura 2** é apresentada a estrutura química dos principais grupos de colorantes naturais.

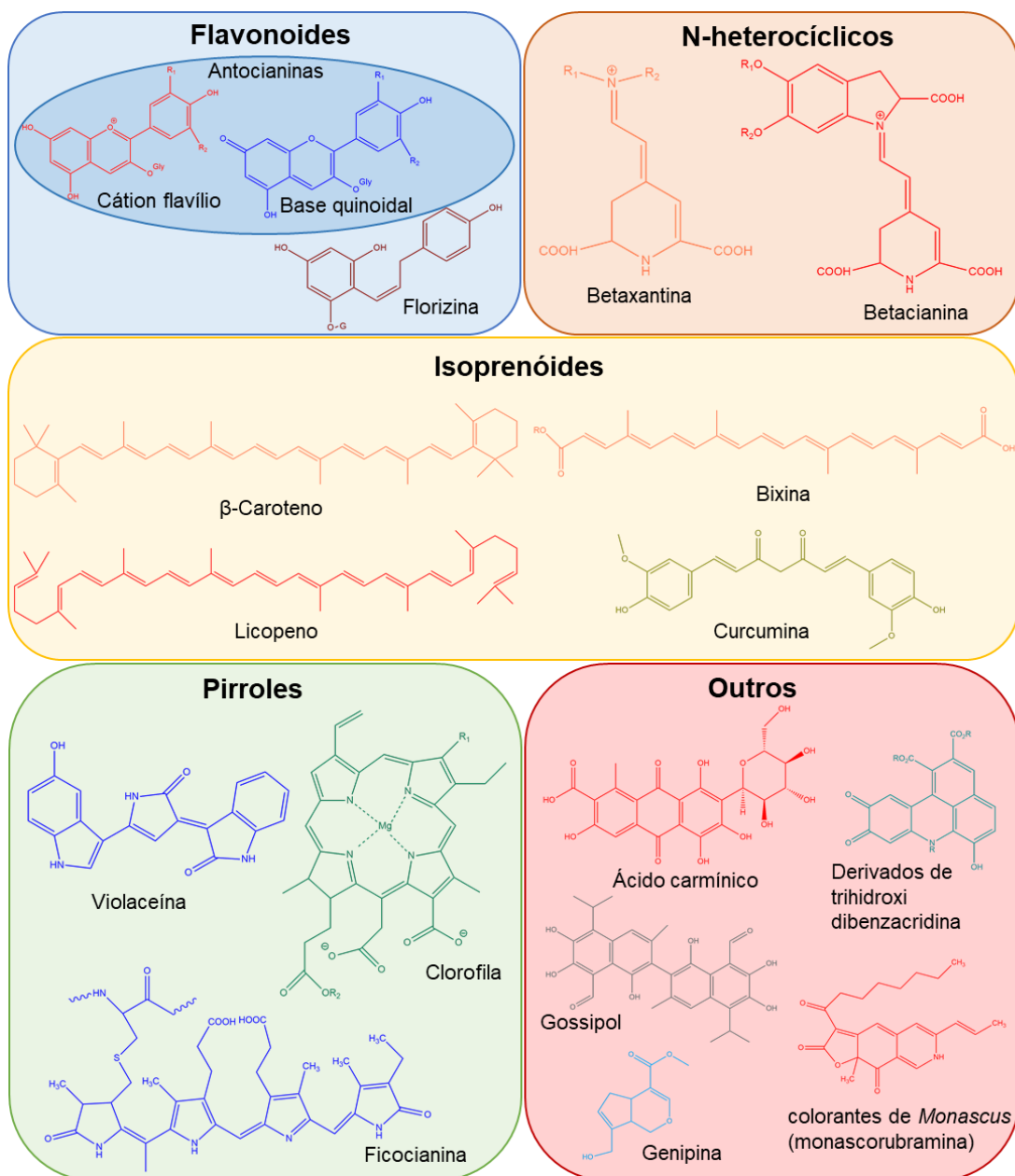


Figura 2. Estrutura química e classificação de alguns colorantes naturais disponíveis para comercialização. (Adaptado de Sigurdson; Tang; Giusti, 2017).

Os colorantes naturais constituem um grupo de moléculas quimicamente heterogêneas e biossinteticamente não relacionadas que são unidas por uma característica comum: sua estrutura eletrônica contém um cromóforo que é responsável pelas cores características desses compostos (TORRES *et al.*, 2016). A maioria dos colorantes naturais de plantas apresentam coloração de vermelho a azul, de acordo com o pH após extração e ocorrem em todos os tecidos de plantas superiores que possuem cor como as folhas, caules, raízes, flores e frutos. Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários vegetais

caracterizados por um esqueleto de carbono $C_6C_3C_6$. Desses compostos polifenólicos, as antocianinas são uma importante subclasse de colorantes solúveis em água que conferem cores vivas às plantas, que varia do vermelho ao azul (OBÓN *et al.*, 2009). Os carotenoides tetraterpenóides variam entre as cores vermelha, laranja e amarela e são conhecidos como caroteno (colorante laranja), luteína (colorante amarelo) e licopeno (colorante vermelho) (GALAFFU; BORTLIK; MICHEL, 2015). A clorofila é um colorante primário que dá cor verde às plantas e é constituída de muitos anéis heteroaromáticos e polipirroles lineares. As betalaínas são colorantes amarelos ou vermelhos como as antocianinas e são solúveis em água, mas ao contrário das antocianinas, são compostos derivados de indol (compostos aromáticos N-heterocíclicos) sintetizados a partir da tirosina. As betalaínas são responsáveis pela cor vermelha da beterraba e são usadas comercialmente como alimento e/ou como agente colorante (BOO *et al.*, 2012).

Entre a diversidade de cores oriundas de colorantes naturais, os tons vermelhos são de particular interesse, porque essa cor é a mais popular dos alimentos e os colorantes naturais vermelhos adequados para uso alimentar são difíceis de obter (CHEN; JOHNS, 1993; VENTURA *et al.*, 2013). No caso da indústria alimentícia, existem pouquíssimas alternativas de colorantes vermelhos naturais, como as antocianinas de origem vegetal e o ácido carmínico do extrato de cochonilha (**Figura 2**). No entanto, esses colorantes não podem ser usados em toda a faixa de pH devido à mudança de coloração e instabilidade da molécula (GHIDOUCHE *et al.*, 2013). Em vários setores industriais, a cor vermelha natural foi considerada a tonalidade mais tecnicamente desafiadora para o desenvolvimento de novos produtos (39 %), seguida por verde (19 %) e azul (13 %), particularmente nas indústrias alimentícias de laticínios, carnes e panificação (DDW, 2013). Essas limitações resultam em restrições de aplicação em várias fases dos sistemas de coloração. Dentro desse contexto, a produção de colorantes naturais por microrganismos constitui-se uma alternativa em relação às fontes vegetais e animais, existindo um grande potencial para produção de colorantes nas tonalidades de amarelo a vermelho.

2.3 Colorantes naturais de origem microbiológica

Os microrganismos constituem uma das fontes biotecnológicas mais versáteis na produção de uma variedade de moléculas, entre elas os colorantes. Isso se deve às vantagens de produção que os microrganismos apresentam sobre as plantas em termos de disponibilidade, por não haver necessidade de grandes áreas terrestres para crescimento, independência de variação sazonal ou localização geográfica, estabilidade, eficiência de produção, rendimentos previsíveis e otimizáveis e fácil processamento pós produção (TULI *et al.*, 2015; VENIL *et al.*, 2014). Comercialmente, muitos colorantes sintetizados por microrganismos já são autorizados e produzidos industrialmente em diversos países, tais como os colorantes vermelhos e o colorante amarelo Ankascin® de *Monascus* sp., astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, Arpink red™ de *Penicillium oxalicum*, riboflavina de *Ashbya gossypii*, β -caroteno de *Blakeslea trispora*, licopeno de *Erwinia uredovora* e *Fusarium sporotrichioides* (CARO *et al.*, 2015; DUFOSSÉ, 2018).

Os colorantes fúngicos estão atualmente recebendo mais atenção do que outros colorantes biológicos devido à sua diversidade de cores (LAGASHETTI *et al.*, 2019). A diversidade de colorantes naturais não se relaciona apenas com a sua estrutura química, mas também com a gama de cores que podem adicionar à paleta de cores ou mesmo uma nova gama de cores (MAPARI; MEYER; THRANE, 2006). Uma das características mais interessantes dos colorantes fúngicos é o potencial para uso como colorantes alimentares funcionais, visto que alguns podem apresentar propriedades biológicas. Algumas espécies de *Talaromyces* sp. e *Monascus* sp. foram reportadas como produtoras de colorantes que apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana, bem como propriedades imunossupressoras, antivirais, anticancerígenas e antiolesterolêmica (KEEKAN *et al.*, 2020; KIM; KU, 2018; ZACCARIM *et al.*, 2018).

Os fungos são organismos eucarióticos e podem produzir uma impressionante gama de metabólitos secundários. Dentre esses, os policetídeos representam uma classe que não exibem íons localizados negativamente carregados e geralmente têm função poli-insaturada, ou seja, um sistema de anéis, um ou mais grupos de carbono, ácido carbólico e grupos funcionais de éster ou amidas que absorvem no espectro UV visível em estrutura de

tetracetídeos a octacetídeos, que possuem quatro ou oito unidades de C₂ (MAPARI; MEYER; THRANE, 2009). Esses compostos são tipicamente sintetizados por poliketídeos sintases (PKS) que unem derivados de ácido carboxílico (acetil-coenzima A (CoA) e malonil-CoA) de forma semelhante à síntese de ácidos graxos. As classes representativas incluem colorantes como antraquinonas, azafilonas, hidroxiantraquinonas, naftalenos, naftoquinonas, flavonoides, melaninas, flavinas, entre outros (GMOSER *et al.*, 2017; LAGASHETTI *et al.*, 2019; VENIL *et al.*, 2014). As azafilonas constituem um subconjunto da classe de poliketídeos e podem ser definidas como uma classe estruturalmente diversa de metabólitos secundários fúngicos, ou seja, colorantes com estruturas de pirona-quinona contendo um núcleo bicíclico altamente oxigenado e um centro quaternário quiral (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; WEI; YAO, 2005) (**Figura 3.A**).

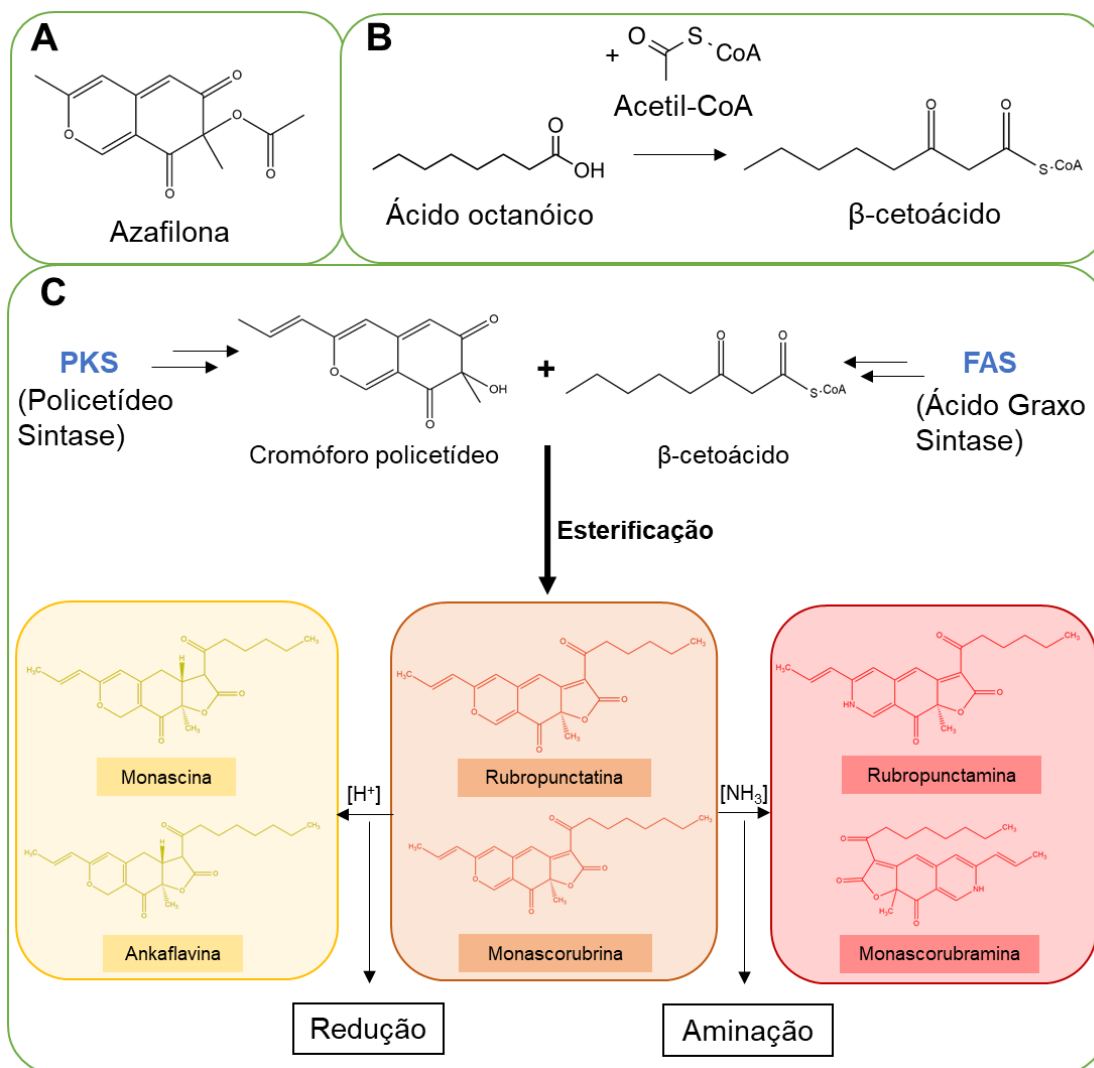


Figura 3. Colorantes produzidos por fungos dos gêneros *Monascus*, *Talaromyces*, *Penicillium* e *Aspergillus*. **(A)** Estrutura das azafilonas evidenciando o núcleo bicíclico altamente oxigenado, que constitui o cromóforo dos colorantes de *Monascus*. **(B)** Resumo da rota de biossíntese do β -cetoácido pela FAS (Ácido graxo sintase). **(C)** Possível rota biossintética das azafilonas coloridas envolvendo a ação da PKS (Policetídeo sintase) e FAS na esterificação de um cromóforo de azafilona e um β -cetoácido (Adaptado de Hajjaj *et al.*, 1997).

As azafilonas são responsáveis pelas cores amarela, vermelha ou verde encontradas em micélios de várias espécies de ascomicetos, incluindo os gêneros *Monascus*, *Talaromyces*, *Penicillium* e *Aspergillus* (DUFOSSE *et al.*, 2014; MAPARI *et al.*, 2009). O nome azafilona surgiu devido à sua afinidade pela amônia: os colorantes reagem com aminas, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, para formar γ -piridonas vinílicas vermelhas ou roxas devido à

troca de oxigênio do pirano por nitrogênio (STADLER *et al.*, 1995; WEI; YAO, 2005). As azafilonas são tradicionalmente classificadas como colorantes vermelhos, laranjas e amarelos com base em sua absorbância máxima em 490–530, 460–480 e 330–450 nm, respectivamente (CHEN *et al.*, 2017b).

Até o presente momento, pouco se sabe sobre as reações biossintéticas e os genes envolvidos na produção das azafilonas. No entanto, há evidências de que pelo menos uma, e possivelmente duas, policetídeo sintases estejam envolvidas na biossíntese, e ainda que, ácidos graxos são possíveis precursores dos colorantes formados (CHEN *et al.*, 2017b; YANG *et al.*, 2015b). A via hipotética de biossíntese envolve a formação de um cromóforo hexacetídeo, reação catalisada pela policetídeo sintase e, posterior, condensação com um β -cetoácido, proveniente de um ácido graxo de cadeia média, produzido pela via biossintética dos ácidos graxos (**Figura 3.B**). No caso dos colorantes de *Monascus*, o cetoácido é ligado à estrutura do cromóforo por uma reação de transesterificação para gerar a monascorubrina, colorante laranja, (ou rubropunctatina mediante transesterificação com ácido hexanóico). A redução do colorante laranja dá origem ao amarelo ankaflavina a partir da monascorubrina (ou monascina da rubropunctatina). Por conseguinte, os colorantes vermelhos são formados quimicamente a partir do laranja por aminação através de uma base de *Schiff* dando origem à monascorubramina e rubropunctamina (HAJJAJ *et al.*, 1997) (**Figura 3.C**).

As mesmas cores existem em duas estruturas moleculares diferindo no comprimento das cadeias alifáticas e são produzidas, principalmente, como colorantes intracelulares com baixa solubilidade em água (WONG; KOEHLER, 1983). Quando determinados grupamentos amina estão presentes no meio de cultivo, reações envolvendo os colorantes contendo os grupos aminofílicos e certos grupamentos amina mudam a localização dos colorantes vermelhos predominantemente ligados à célula para o meio extracelular (SHAH *et al.*, 2014). No desenvolvimento de um bioprocesso, a exportação do metabólito de interesse para fora da célula microbiana é uma vantagem, pois diminui o número de etapas requeridas no processo de *downstream* diminuindo os custos de produção (MEITZ *et al.*, 2014; STRUBE *et al.*, 2011).

O uso de *Monascus* sp. para a produção de azafilonas é o mais antigo registrado e têm sido frequentemente encontrados em alimentos orientais, como

o *koji* vermelho ou *angkak*, o arroz fermentado usado na Ásia durante séculos como colorante alimentar em vinho tinto de arroz, queijo vermelho de soja, carne e produtos de peixe (DUFOSSÉ *et al.*, 2005; NARSING RAO; XIAO; LI, 2017). Desta forma, as azafilonas também são chamadas de "colorantes *Monascus*" e um número superior a 100 tipos de colorantes típicos de *Monascus* foram identificados e isolados de *Monascus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (CHEN *et al.*, 2019). Nesse sentido, o fungo *Monascus* tem sido alvo de muitos estudos visando a produção de colorantes (SHI *et al.*, 2015; TERÁN HILARES *et al.*, 2018; VENDRUSCOLO *et al.*, 2016a).

Segundo a literatura, os colorantes produzidos por esse microrganismo apresentam estabilidade na faixa de pH de 2 a 10, estabilidade ao calor e um amplo espectro de cores (MAPARI *et al.*, 2005; MAPARI; MEYER; THRANE, 2006). Contudo, juntamente com o colorante, o microrganismo produz a micotoxina citrinina que reduz o seu valor comercial e impede sua aplicação como colorante pelas agências regulatórias do Brasil (ANVISA), Europa (EFSA) e Estados Unidos (FDA) (KALLSCHEUER, 2018; YANG *et al.*, 2015a). Por esse motivo, diversos estudos com o gênero *Monascus* focaram por muito tempo na redução da produção de citrinina e não no aumento da produção dos colorantes (DE CARVALHO *et al.*, 2005; HAJJAJ *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2014; OROZCO; KILIKIAN, 2008).

Assim, outros microrganismos vêm sendo estudados visando a produção de colorantes naturais com aplicabilidade industrial. Dentre esses, foi relatado que o fungo filamentoso *T. amestolkiae* produz colorantes naturais com atividade biológica (antimicrobiana) (ZACCARIM *et al.*, 2018). Além disso, diferentemente de *Monascus* sp., a maioria das espécies que pertencem ao gênero *Talaromyces* não produzem micotoxinas, viabilizando a aplicabilidade industrial em produtos como alimentos, fármacos e têxteis (FRISVAD *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2012; TOLBORG *et al.*, 2020).

2.4 *Talaromyces amestolkiae*

O gênero *Penicillium* compreende quatro subgêneros, *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium* e *Biverticillium*. No entanto, foi observado que o subgênero *Biverticillium* é filogeneticamente distinto de outros subgêneros de *Penicillium* e que essa distinção deve ser refletida em sua taxonomia (PITT, 1979). Nesse

sentido, seguindo o conceito de nomenclatura de nome único, 40 espécies de *Penicillium* subg. *Biverticillium* foram transferidas e combinadas em *Talaromyces*. Benjamin (1955) introduziu o nome *Talaromyces* como uma metamorfose sexual e este gênero foi caracterizado como produtor de ascomas amarelos suaves que consistem em hifas entrelaçadas. O delineamento, a composição de espécies e a classificação taxonômica deste grupo foram modificados com base em fatores morfológicos e ecológicos.

Assim, as espécies dos estágios sexuais anamórficas de *Penicillium* foram classificadas em *Eupenicillium* e *Talaromyces* (PITT, 2014). Isso significa que *Talaromyces sensu stricto* agora contém espécies que podem se reproduzir sexualmente (ascomata) e/ou assexualmente (conidióforos). Os conidióforos desse gênero emergem a partir do micélio reprodutor e apresentam conídio elipsoidal de parede lisa e esterigma terminal biverticiladas com ramificação. Em meio Batata Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura (BDA-YE) ocorre difusão intensa e rápida de pigmentação vermelha (**Figura 4**). A produção de colorantes tem sido estudada por fungos do filo *Ascomycota*, que apresentam reprodução sexuada (teleomórfica) e assexuada (anamórfica), sendo observado nos indivíduos que compõem esse filo um micélio septado. A meiose, algumas vezes seguida por divisão mitótica, ocorre na formação sexuada de ascósporos dentro de um asco, na classe *Eurotiomycetes* (YILMAZ *et al.*, 2012).

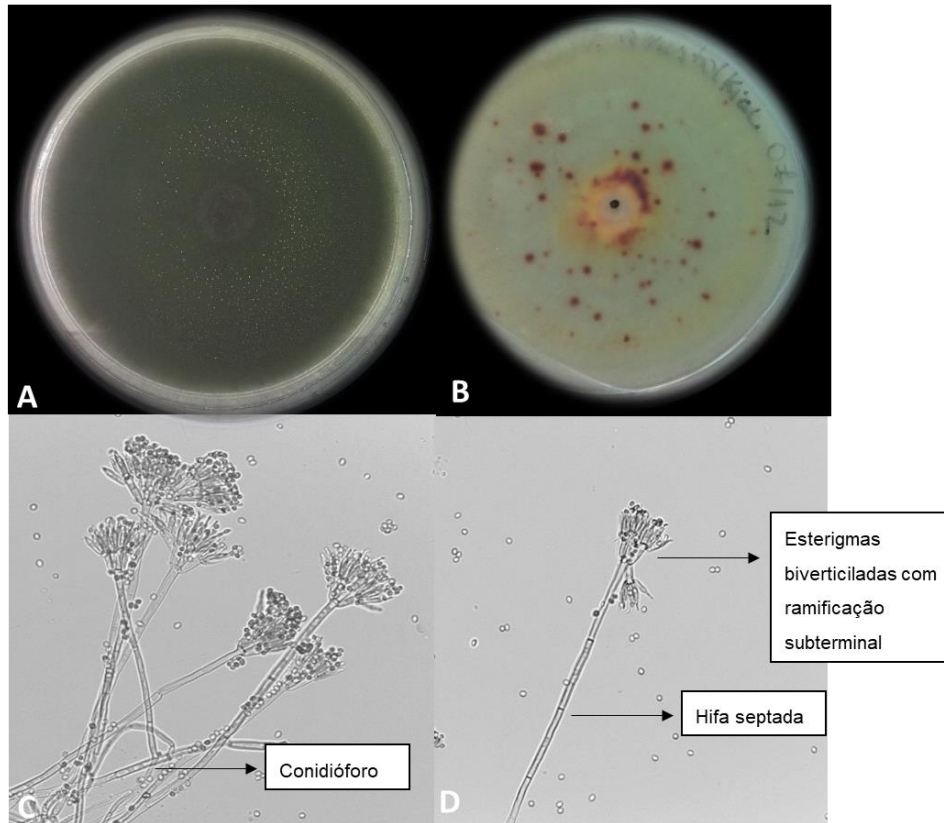


Figura 4. Aspecto morfológico de *T. amestolkiae*. **(A)** e **(B)** Aspecto macroscópico de *T. amestolkiae* em placa de Petri contendo BDA-YE (frente e verso) e apresentando excreção dos colorantes para o meio. **(C)** e **(D)** Microscopia de campo claro do *T. amestolkiae* caracterizando os conidióforos e as hifas. Colônias incubadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA-YE a 30 °C por 7 dias (Ampliação de 100X). (Fonte: Autoria própria).

As espécies de *Talaromyces* geralmente produzem colorantes amarelo, laranja e vermelho no micélio ou como colorantes difusos no meio de cultivo. Algumas espécies do gênero *Talaromyces* excretam altas quantidades de colorantes vermelhos, incluindo as espécies *T. amestolkiae*, *T. atroroseus*, *T. purpurogenus* e *T. albobiverticillius* (PANDIT *et al.*, 2018; SAMSON *et al.*, 2011; SANTOS-EBINUMA *et al.*, 2013; TOLBORG *et al.*, 2020; VENKATACHALAM *et al.*, 2019). Especificamente, a espécie *T. amestolkiae* produz colorantes da classe das azafilonas derivados de policetídeos semelhantes aos colorantes de *Monascus* (SAMSON *et al.*, 2011; YILMAZ *et al.*, 2012). Adicionalmente, já foi reportado na literatura que colorantes produzidos por *T. amestolkiae* apresentam atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e baixa citotoxicidade

contra células de fibroblastos (ZACCARIM *et al.*, 2018), sinalizando o seu potencial uso na indústria farmacêutica ou na indústria alimentícia para aplicação em alimentos funcionais.

Apesar dos benefícios do uso de colorantes de origem microbiana, esforços têm sido feitos para reduzir os custos do processo, uma vez que colorantes sintéticos ou extraídos de fontes vegetais geralmente apresentam custos de produção menores (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019). O alto custo do processo de fermentação para a obtenção dos colorantes está relacionado, principalmente, pelo custo dos substratos de cultivo. Por exemplo, o custo total da produção de 50 L de prodigiosina de *Serratia marcescens* UTM1 usando meio de crescimento comercial (caldo nutritivo) é de US\$ 58,61 contra US\$ 5,91 usando substratos agrícolas. Outro exemplo é o alto custo da produção do β -caroteno por bactérias, que é aproximadamente de US\$ 1000/kg contra US\$ 500/kg para síntese do colorante amarelo sintético tartrazina (amarelo número 5, E102) (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

2.5 Cultivo submerso

2.5.1 Parâmetros que afetam a produção de colorantes

Existem diversas formas de condução de processo ao se trabalhar com cultivo de microrganismos. Entre eles, pode-se citar o processo em batelada (também denominado descontínuo), no qual todos os nutrientes requeridos durante o cultivo, exceto oxigênio, em processos aeróbios, ou componentes químicos para ajustes de pH, são adicionados antes do início do cultivo e o produto é retirado somente no término de cada operação (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Um processo típico de produção biotecnológica pode ser dividido nas seguintes etapas: (a) *upstream* (preparação do meio de cultura e cultivo); (b) *downstream* (extração e purificação); (c) formulação. O processo *downstream* inclui etapas de (i) preparação; (ii) isolamento de sua molécula de interesse; (iii) purificação e (iv) polimento (MEITZ *et al.*, 2014; STRUBE *et al.*, 2011). Visando uma produção econômica com qualidade uniforme na etapa *upstream*, além de se trabalhar com uma espécie específica, é importante ter conhecimento dos fatores que afetam a produção da biomolécula alvo, como o tipo de cultivo (fermentação sólida, semi-sólida e submersa), pH, fontes de carbono, nitrogênio

e outros nutrientes, viscosidade do caldo de cultivo, oxigênio dissolvido (para microrganismos aeróbios), frequência de agitação e taxa de aeração (OROZCO; KILIKIAN, 2008; TERÁN HILARES *et al.*, 2018; VENDRUSCOLO *et al.*, 2016a).

Os colorantes fúngicos são metabólitos secundários que, muitas vezes, não têm função conhecida (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010). Esses metabólitos são compostos que não estão envolvidos nas vias bioquímicas essenciais para o crescimento e a reprodução dos microrganismos, ao contrário dos metabólitos primários, e são representados por processos como síntese de proteínas, biossíntese de ácidos graxos e policetídeos. A síntese dos metabólitos secundários está relacionada à velocidade baixa de crescimento microbiano, sendo sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária. Os metabólitos secundários são normalmente derivados do substrato utilizado ou quando grandes quantidades dos precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumulados (HAJJAJ *et al.*, 1999). Há uma série de trabalhos sobre as necessidades nutricionais de várias espécies de *Monascus* focados na importância de certos açúcares e fontes de nitrogênio para a produção de colorantes (DE OLIVEIRA; DA COSTA; VENDRUSCOLO, 2019; KONGRUANG, 2011; SHI *et al.*, 2015; VENDRUSCOLO *et al.*, 2016b). No entanto, na maioria desses estudos, a descrição dos fatores que contribuem para o crescimento do microrganismo e/ou a síntese de colorantes ainda são escassas e superficiais.

Por serem metabólitos secundários, a produção, composição e excreção dos colorantes depende da velocidade de crescimento do microrganismo, dos nutrientes disponíveis, como o tipo de fonte de nitrogênio, e uso de cepas específicas (MIYAKE *et al.*, 2008). A principal fonte de nitrogênio pesquisada na produção de colorantes por fungos filamentosos em cultivo submerso tem sido de origem complexa como extrato de levedura e peptona de carne (SANTOS-EBINUMA; TEIXEIRA; PESSOA, 2013; ZACCARIM *et al.*, 2018). Fontes complexas de nitrogênio são ideais para o crescimento microbiano, no entanto, uma parte dos colorantes produzidos permanecem intracelulares apresentando baixa taxa de excreção (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; LIN; DEMAINE, 1991). Os colorantes extracelulares são preferidos, pois são solúveis no meio de cultivo e as etapas de *downstream* são mais simples e baratas (VELMURUGAN *et al.*, 2010). Além disso, a maioria das cepas fúngicas produz uma mistura de

moléculas de colorantes e o desafio é produzir uma molécula colorida específica e extracelular com alto rendimento.

Recentemente, várias espécies de *Monascus*, *Penicillium* e *Talaromyces* têm sido reportadas como cepas produtoras de colorantes azafilona solúveis em água, tais como N-glutarilmonascorubramina, N-glutarilrubropunctamina, 6-[(Z)-2N-Carboxivinil]-GABA-PP-V e PP-R-[(10Z)-7-(2-Hidroxietil)]-monascorubramina (VENKATACHALAM *et al.*, 2018; YILMAZ *et al.*, 2012). A adição de fontes de nitrogênio apropriadas no meio de cultivo, como os aminoácidos, pode facilitar a liberação e a solubilização desses colorantes (PASTRANA *et al.*, 1995). Os colorantes vermelhos policetídicos são quimicamente similares aos laranjas diferindo apenas pela presença de um grupo -NH no lugar de um grupo -O. Essa modificação química ocorre através de uma reação aminofílica entre os colorantes laranjas policetídicos e uma amina primária (CHEN *et al.*, 2017b; SHI *et al.*, 2016). O glutamato monossódico (GMS) tem sido utilizado para melhorar a eficiência de produção de colorantes vermelhos extracelulares, pois serve tanto como fonte de nitrogênio quanto como espécie reativa na formação de um complexo ácido glutâmico-colorante, que leva à eventual excreção para o meio (HAJJAJ *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 1992) (**Figura 5**).

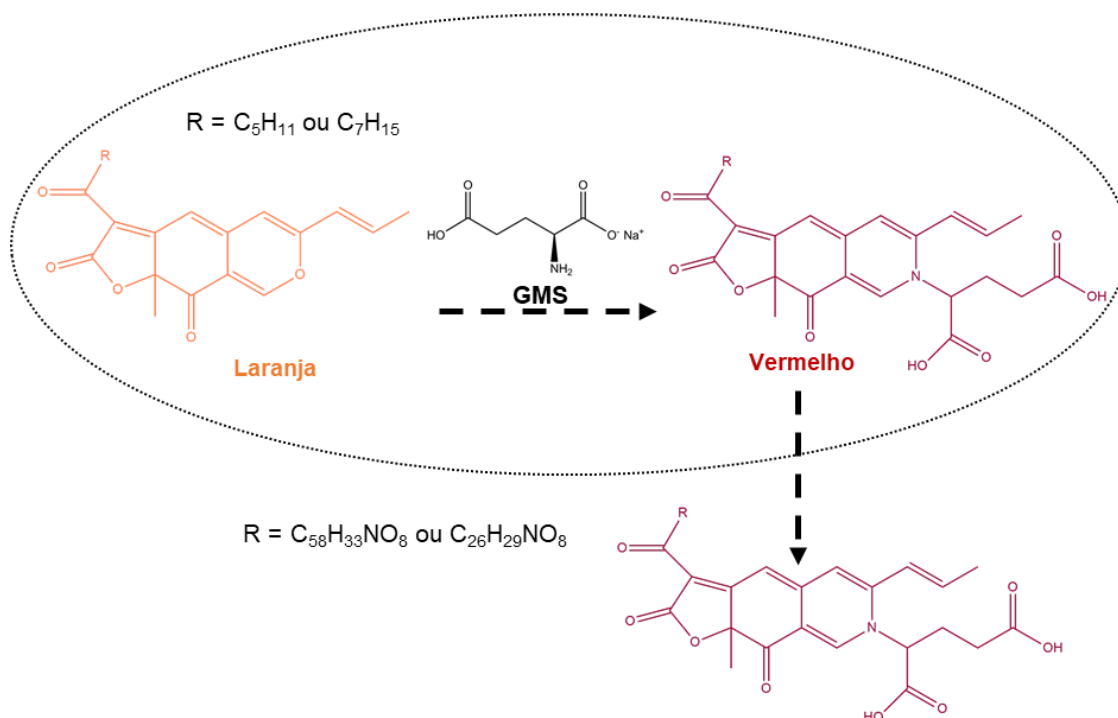


Figura 5. Representação esquemática da reação aminofílica entre os colorantes laranjas (monascorubrina ou rubropunctatina, R = C₅H₁₁ ou C₇H₁₅) de *Monascus anka* e o GMS, a qual pode ocorrer no interior das células durante o cultivo submerso e desencadeia a excreção no meio de cultivo dos colorantes vermelhos (N-gutarilmonascorubramina ou N-glutarilrubropunctamina, R = C₂₈H₃₃NO₈ ou C₂₆H₂₉NO₈) solúveis em água, apresentando o resíduo GMS (seta pontilhada). (Adaptado de Xiong *et al.*, 2015).

Jung *et al.* (2003) estudaram as características colorimétricas e estruturais dos colorantes de *Monascus* produzidos a partir de vários aminoácidos adicionados ao meio de cultivo. Esses autores relataram que dependendo do aminoácido precursor, pode-se determinar as quantidades de colorantes amarelo, laranja e vermelho produzidos durante a fermentação. Os resultados indicaram que os compostos hidrofóbicos amarelos e laranjas foram produzidos independentemente do aminoácido precursor. No entanto, quando aminoácidos hidrofílicos, como ácido aspártico e ácido glutâmico, foram usados como suplementos, os colorantes eram geralmente mais hidrofílicos. Em adição, as análises estruturais mostraram que os aminoácidos usados como suplementos foram aparentemente incorporados na estrutura dos colorantes.

Entre os parâmetros que mais afetam o crescimento e a produção de colorantes por fungos filamentosos, o pH exerce um papel essencial nos

colorantes produzidos (OROZCO; KILIKIAN, 2008; SHI *et al.*, 2015; TERÁN HILARES *et al.*, 2018). Variações no pH do meio de cultivo em processos empregando o gênero *Monascus* sp. alteram a proporção entre os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos produzidos, como também a sua liberação no meio, principalmente, dos colorantes vermelhos (MUKHERJEE; SINGH, 2011). A influência do pH na formação destas biomoléculas está associada, principalmente, à forma química dos seus precursores. Vendruscolo *et al.* (2016b) estudaram a influência do pH na produção de colorantes por *Monascus ruber* através do ponto isoelétrico dos aminoácidos usados no meio de cultivo. Para a formação dos colorantes vermelhos, o íon NH_3^+ dos aminoácidos deve estar na forma protonada para interagir com o colorante laranja. De acordo com os autores, o ponto isoelétrico dos aminoácidos influencia na protonação dos grupos e é nesta característica que o pH tem importância no processo de formação dos colorantes ao se empregar aminoácidos no meio de cultivo. No trabalho acima reportado, os autores avaliaram o aminoácido glicina e verificaram que os colorantes amarelos eram produzidos em valores de pH entre 2,0 e 3,0, os laranjas na faixa entre 3,0 e 4,0 enquanto os vermelhos em pH acima de 5,0, pois nesta última condição o valor do pH é superior ao ponto isoelétrico da glicina.

Embora uma grande quantidade de trabalhos sobre a produção de colorantes por fungos já terem sido publicados, faltam informações consistentes sobre o desempenho do cultivo em biorreatores. A melhoria dos processos geralmente é realizada em biorreatores em escala de bancada e, em seguida, dimensionada para equipamentos de escala industrial para produção comercial (LV *et al.*, 2017). Até o momento, a maioria dos cultivos com base em colorantes fúngicos foram realizados em escala de laboratório usando frascos do tipo Erlenmeyer em agitador rotativo. No entanto, a viabilidade de atingir uma escala comercial de colorantes fúngicos dependerá da melhoria bem sucedida da síntese do colorante e da reprodutibilidade de cultivo em biorreatores.

Para alcançar processos reprodutíveis, é necessário estabelecer protocolos padronizados de cultivo em escala de bancada (DUFOSSE, 2006). Vale ressaltar que abordagens integradas para avaliar o desempenho celular (com base nas taxas de crescimento e morfologia do microrganismo) em biorreator podem levar a uma melhora significativa na produção de colorantes

fúngicos. Ademais, por ser um processo aeróbio, para tornar viável a ampliação de escala da produção de colorantes fúngicos, é indispensável primeiro definir o meio de cultivo e as condições de agitação e aeração mais adequadas ao processo (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

2.5.2 Aumento de escala

Como citado anteriormente, grande parte dos cultivos de células fúngicas têm sido estudados em escala laboratorial alterando fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a síntese dos colorantes, onde os objetivos eram entender o desempenho do processo fermentativo e obter altos rendimentos em termos de intensidade de cor e não com foco em uma molécula específica (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020; TOLBORG *et al.*, 2020). O desenvolvimento de novos colorantes para diversos fins industriais é desafiador, pois os colorantes precisam ser seguros, compatíveis com a matriz a qual serão aplicados, sintetizados a partir de processos sustentáveis e que, em última instância, tenham impacto mínimo no preço do produto final (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; WROLSTAD; CULVER, 2012).

Nesse contexto, existem ainda deficiências no desenvolvimento de cultivos submersos para produção de colorantes fúngicos que sejam economicamente viáveis e reprodutíveis (SHI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015a). Tais deficiências como a mudança no comportamento reológico do caldo de cultivo durante o processo fermentativo devido à alteração da composição do substrato, concentração de biomassa e morfologia dos microrganismos podem ser contornadas através da compreensão da fisiologia microbiana e interações do microrganismo com o meio (CHO *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2002).

A ampliação de escala pode ser definida como um procedimento em que os resultados experimentais com equipamento de menor escala são empregados para projetar e construir um sistema de maior escala, sendo considerado um importante passo no desenvolvimento de processos (OKONKOWSKI *et al.*, 2005). De acordo com Mavituna (1996) o aumento de escala está condicionado a ensaios iniciais em bancadas de laboratório, para que estes sejam, em seguida, testados em escala piloto e industrial. De acordo com Stanbury; Whitaker; Hall (1995) e Okonkowski *et al.* (2005) há vários fatores

que devem ser considerados ao analisar-se o aumento de escala até chegar ao nível industrial, dentre eles podemos citar: preparação do inóculo, esterilização e parâmetros ambientais (disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, teor de oxigênio dissolvido, condições de cisalhamento, concentração de dióxido de carbono dissolvido e formação de espuma). No caso de processos aeróbios, a agitação e aeração, seja em termos de volume de mistura ou disponibilidade de oxigênio, são parâmetros muito importantes no aumento de escala (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

2.5.2.1 Agitação e aeração em cultivo submerso

Agitação e aeração são parâmetros de grande influência no crescimento e na produção de metabólitos secundários por microrganismos aeróbios, dentre eles *M. ruber* e *T. amestolkiae* (GOMEZ *et al.*, 2015; HAJJAJ *et al.*, 2000a; OLIVEIRA *et al.*, 2020). A agitação é responsável por manter a homogeneidade do sistema em termos de homogeneidade de massa e energia, mantendo os microrganismos em suspensão. A aeração é responsável pelo suprimento de oxigênio para que os microrganismos executem suas atividades metabólicas e também ajuda a manter os microrganismos em suspensão (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; GOMEZ *et al.*, 2015).

Os microrganismos aeróbios necessitam de oxigênio dissolvido no meio, necessário para o crescimento celular e responsável pela produção de metabólitos. O suprimento de oxigênio em cultivos submersos é promovido por meio da dissolução de oxigênio contido na fase gasosa para a fase líquida pela passagem através da interface gás-líquido, de modo a estar disponível para o consumo microbiano através da respiração pela passagem através da interface líquido-membrana celular. Quando em baixa disponibilidade, afeta diretamente o desempenho do processo (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010; GOMEZ *et al.*, 2015).

Um dos principais problemas da transferência de oxigênio, no entanto, é a sua baixa solubilidade em água. À pressão ambiente e à temperatura de 30 °C – condições típicas de um processo aeróbio – a concentração de oxigênio saturado em água destilada é de 0,23 mmolL⁻¹ (7,5 mgL⁻¹) (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001). O $k_L a$ é definido como coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹), onde “a” representa a área interfacial gás-líquido e k_L é o coeficiente de transferência de massa com base na película

líquida, que é dependente da difusividade do oxigênio e da espessura da película estagnada. Sendo C é a concentração de oxigênio dissolvido (OD) na fase líquida e C_s é a concentração de oxigênio que está em equilíbrio com o teor de oxigênio na fase gasosa, tem-se que a variação de C com o tempo devido à transferência da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura é dada por:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a. (C_s - C) \quad \text{equação 1}$$

onde a variação de oxigênio dissolvido no meio de cultura com o tempo (dC/dt) é resultado da diferença do que é transferido ($k_L a. (C_s - C)$).

Aumentando-se a pressão parcial de oxigênio no gás de aeração, ou seja, aumentando-se a velocidade de transferência de oxigênio, aumenta-se o teor de oxigênio na fase gasosa no cultivo devido ao acréscimo de C_s e, conseqüentemente, da força motriz ($C_s - C$). Altas frequências de agitação acarretam em aumento da velocidade de transferência gás-líquido devido à diminuição da espessura da película estagnada (k_L) e devido a maior área específica “ a ” pela fragmentação de bolhas, resultando em um acréscimo global do $k_L a$, ou seja, incremento na transferência de oxigênio (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001; VENDRUSCOLO *et al.*, 2012).

O $k_L a$ é um parâmetro extensivamente estudado no aumento de escala de processos aeróbios. Isso se deve ao fato que para uma determinada força motriz, um aumento no valor de $k_L a$ melhora a taxa de transferência de oxigênio e seu valor expressa a capacidade do equipamento de transferir oxigênio independente do volume do reator (GALACTION *et al.*, 2004; GILL *et al.*, 2008). O $k_L a$ é significativamente influenciado por uma série de fatores, como características geométricas e operacionais dos vasos, tipo de impelidor empregado, frequência de agitação, vazão de ar, componentes do meio de cultivo, morfologia do microrganismo e a reologia do caldo de cultivo (GALACTION *et al.*, 2004).

A morfologia de microrganismos filamentosos desempenha um papel importante no seu metabolismo durante o processo fermentativo. A concentração celular e a morfologia do microrganismo afetam as propriedades reológicas do caldo de cultivo, afetando a produção de metabólitos de interesse

(QUINTANILLA *et al.*, 2015; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018). Dada a relação complexa e não intuitiva entre morfologia fúngica e produtividade de metabólitos secundários, inúmeros esforços têm sido feitos para controlar a macromorfologia de microrganismos filamentosos usando abordagens abióticas como o fornecimento de oxigênio (YANG *et al.*, 2015), pH (VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018), tamanho do inóculo (PAPAGIANNI; MATTEY, 2006), além de outros (KIM *et al.*, 2002).

As formas morfológicas mais comuns de fungos filamentosos são as hifas ramificadas, hifas isoladas e aglomerações de micélios chamados de *pellets* (GRIMM *et al.*, 2005; QUINTANILLA *et al.*, 2015). Em cultivos que as hifas ramificadas predominam, o caldo de cultivo resulta em um fluido heterogêneo e viscoso com características reológicas de fluidos não-Newtonianos (BLANCH; BHAVARAJU, 1976). Muitos estudos têm demonstrado que a viscosidade aparente de cultivos de microrganismos filamentosos contendo altas concentrações de biomassa é alta. Assim, esse tipo de fluido não segue a equação de proporcionalidade entre o valor da tensão de cisalhamento aplicada e o coeficiente de viscosidade dinâmica, assumindo problemas de transferência de massa (CHO *et al.*, 2002; CHOI; PARK; OKABE, 2000; LV *et al.*, 2017).

Por outro lado, os *pellets* são compostos por aglomerações de hifas, com formas que vão do esférico ao alongado podendo apresentar superfície lisa ou ramificada. Em caldos de cultivo que predominam a morfologia de *pellets*, a viscosidade aparente é baixa, o que é uma vantagem, pois as condições de mistura e transferência de oxigênio são muitas vezes facilitadas. A maior desvantagem dos *pellets* é a difusão limitada de nutrientes e oxigênio dissolvido do caldo de cultivo para o interior do *pellet* (EL-ENSHASY, 2007; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015). Portanto, as variáveis hidrodinâmicas do biorreator afetam significativamente a morfologia celular através das condições de cisalhamento impostas às células fúngicas (LIN; SCHOLZ; KRULL, 2010; YU *et al.*, 2012).

Como a difusão natural em líquidos é relativamente lenta, o biorreator do tipo tanque agitado pode proporcionar uma melhor homogeneização do meio através dos agitadores rotativos providos de motor e eixo com impelidores. Os impelidores geram linhas de corrente de alta velocidade que, por sua vez, arrastam regiões de líquido estagnadas ou mais lentas, resultando em mistura

uniforme por transferência de momento. À medida que a viscosidade do líquido aumenta, o processo de mistura torna-se mais difícil, uma vez que o atrito retarda as linhas de corrente de alta velocidade e confina-os ao redor do impelidor (HOLLAND; BRAGG, 1995).

Os impelidores também são importantes no processo de transferência de massa gás-líquido. A mistura proporcionada pelos impelidores cria certa uniformidade das bolhas de gás dentro do reator. Quando utilizados em conjunto – geralmente em processos fermentativos aeróbios – são responsáveis por assegurar a distribuição do gás por todo o equipamento. Portanto, a agitação tem influência nos valores dos coeficientes de transferência de calor e de massa, evita a precipitação de sólidos e facilita sua dissolução, aumentando a capacidade de mistura gás/líquido e permitindo a manipulação da velocidade superficial dos gases liberados (GOGATE; BEENACKERS; PANDIT, 2000). A seleção de um impelidor eficiente determina as condições de cisalhamento que podem afetar as células microbianas no cultivo em biorreator tanque agitado, influenciando assim na eficiência de crescimento, quebra da parede celular, formação de produtos e possivelmente alterando a morfologia filamentosa (ZHONG, 2010). O processo de agitação pode danificar tanto os *pellets* quanto as estruturas de hifas isoladas ou ramificadas (ŽNIDARŠIČ; PAVKO, 2001).

A direção e a magnitude da mistura são pontos críticos em sistemas com agitação mecânica. A direção dos vetores de velocidade e sua magnitude em fluidos viscosos e em regime turbulento são constantes. Na literatura, são comumente conhecidas como linhas de corrente ou padrão de escoamento. Essas correntes são responsáveis pela mistura e dependem do tipo de impelidor utilizado (COKER, 2001). Para exemplificar, o padrão de escoamento gerado por impelidores do tipo turbina Rushton e do tipo orelha de elefante são ilustrados na **Figura 6**. De modo geral, linhas de corrente para escoamento radial são ideais para dispersão de fluidos – as quais necessitam altos níveis de cisalhamento. Linhas de corrente para escoamento axial são mais adequadas em operações de mistura, suspensão de sólidos e transferência de calor (COKER, 2001).

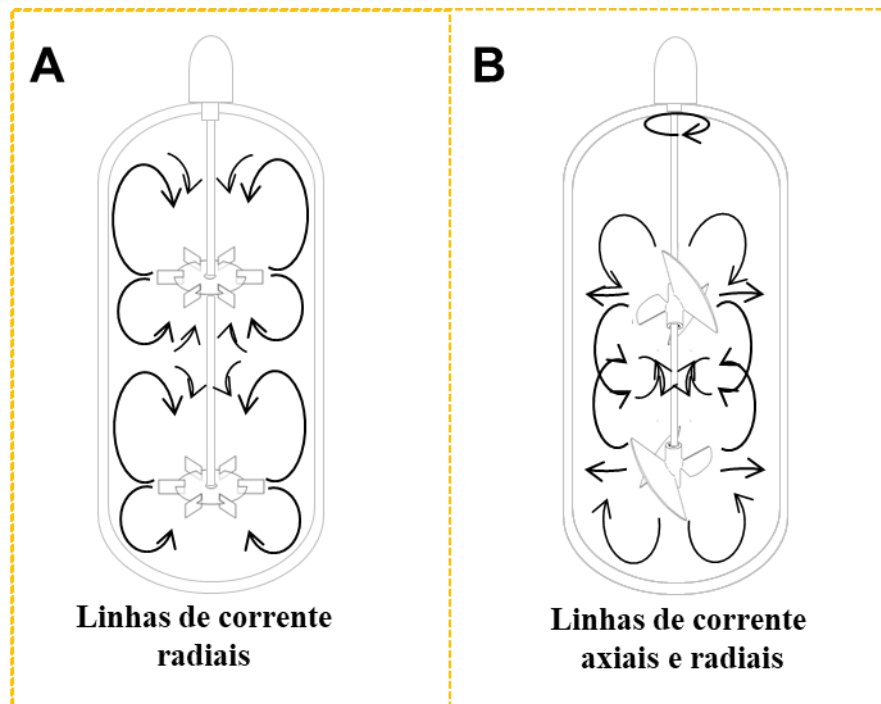


Figura 6. (A) Linhas de corrente para escoamento radial produzidas por impelidor do tipo turbina Rushton. **(B)** Linhas de corrente mistas para escoamento radial e axial produzidas por impelidor do tipo orelha de elefante. (Adaptado de Holland; Bragg, 1995).

O padrão de escoamento radial gera linhas de corrente perpendicularmente ao eixo do agitador, ou seja, impulsiona a massa líquida contra as paredes do tanque e possuem alto consumo de potência, grande capacidade dispersiva e são considerados agressivos às células microbianas. Os modelos de impelidores do tipo turbina de pás retas, turbina de pás inclinadas e turbina de disco, tais como as turbinas Rushton, são responsáveis por gerar esse tipo de escoamento. O padrão de escoamento axial é aquele que gera linhas de corrente paralelas ao eixo do agitador, ou seja, impulsiona a massa líquida contra o fundo do tanque, seu consumo de potência é baixo, possuem grande abrangência por sua distribuição geométrica das linhas de corrente dentro do tanque. São encontrados nos modelos de hélice marítima, turbinas de pás inclinadas e orelha de elefante (COKER, 2001; HOLLAND; BRAGG, 1995).

A turbina Rushton é o impelidor mais usado para a mistura em processos biológicos aeróbicos (DORAN, 2013). No entanto, a orelha de elefante produz um padrão de escoamento misto axial e radial, o que a tornou amplamente estudada para sistemas biológicos sensíveis às tensões de cisalhamento, como

cultivos de células animais e fungos. Isso se deve, principalmente, à baixa força de cisalhamento imposta ao microrganismo e características satisfatórias de transferência de oxigênio. Com isso, diferentes impelidores envolvem distintas forças motrizes e, portanto, características de transferência de massa divergentes, resultando em, eventualmente, danos celulares e redução da produtividade (NIENOW, 2010). Portanto, definir não somente a melhor forma de condução do processo, mas também o tipo de impelidor e a taxa de aeração/agitação são fatores essenciais para um bom desenvolvimento de processos em biorreator tanque agitado.

Diante do exposto, este trabalho visou estudar a produção de colorantes naturais por cultivo submerso de *T. amestolkiae* tanto em agitador rotativo quanto em biorreator tanque agitado de bancada operando os processos em modo batelada de forma a desenvolver um processo viável industrialmente. Assim, as características dos colorantes produzidos sob diferentes condições também foram estudadas.

Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar o processo de produção e a estabilidade dos colorantes obtidos em cultivo submerso de *T. amestolkiae* em agitador rotativo e biorreator tanque agitado de bancada.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da fonte de nitrogênio na produção de colorantes por *T. amestolkiae* em agitador rotativo;
- Utilizar planejamentos estatísticos a fim de melhorar a produção de colorantes em agitador rotativo;
- Avaliar a suplementação do meio GMS-glicose com diversas fontes de amina em agitador rotativo;
- Avaliar o crescimento do microrganismo e a reologia do caldo de cultivo ao longo do tempo utilizando diferentes fontes nutricionais em agitador rotativo;
- Avaliar a influência da composição do meio do inóculo, vazão de ar, controle de aeração e tipo de impelidor empregado para produção de colorantes por *T. amestolkiae* em biorreator do tipo tanque agitado operando os processos em modo batelada;
- Verificar a estabilidade dos colorantes em diversos valores de pH;
- Verificar os padrões de cor dos colorantes na presença dos sais K_3PO_4 e $MnSO_4$.

Materiais e Métodos

A condução dos experimentos foi realizada em 6 etapas, descritas na **Figura 7**.

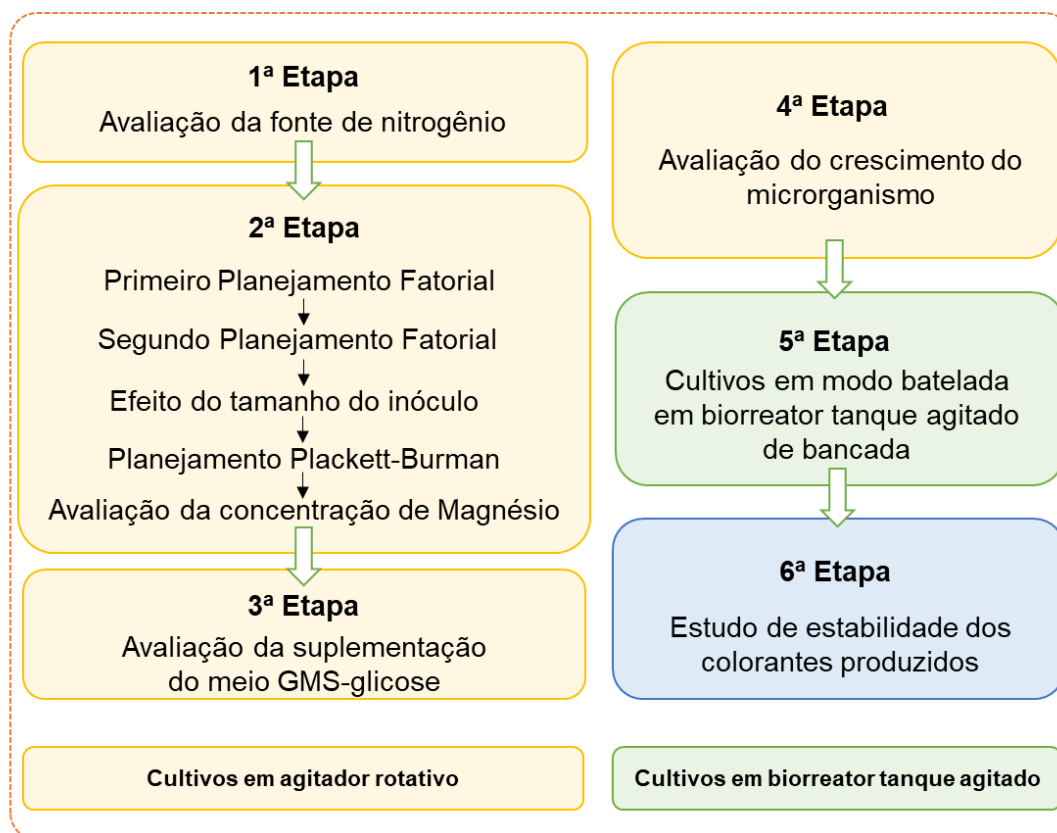


Figura 7. Fluxograma representando a condução dos experimentos para a produção de colorantes naturais por *T. amestolkiae*.

1ª etapa: Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de colorantes em cultivo submerso de *T. amestolkiae* em agitador rotativo.

2ª etapa: Produção de colorantes em cultivo submerso de *T. amestolkiae* em agitador rotativo avaliando, através de planejamentos estatísticos, as variáveis: pH, concentração de glicose, concentração de GMS, tamanho do inóculo, presença e concentração de macro e micronutrientes. Nesta etapa, definiu-se o meio GMS-glicose empregado nas etapas posteriores.

3ª etapa: Avaliação do efeito da suplementação do meio GMS-glicose definido na etapa anterior com fontes de aminas provenientes de fontes complexas de nitrogênio (extrato de levedura, extrato de carne e peptona de carne), aminoácidos e vitaminas para produção de colorantes em agitador rotativo.

4ª etapa: Avaliação do crescimento do microrganismo e da reologia do caldo de cultivo ao longo de 168 h de cultivo submerso em agitador rotativo empregando o meio GMS-glicose e o meio contendo fonte complexa de nitrogênio definido por Zaccarim *et al.* (2018).

5ª etapa: Após selecionar as melhores condições para produção de colorantes vermelhos a partir das etapas anteriores (frascos agitados), os cultivos foram conduzidos em batelada em biorreator tanque agitado de bancada. A influência da composição do meio do inóculo, vazão de ar, controle de aeração e tipo de impelidor empregado foram os focos desta etapa.

6ª etapa: Estudo de estabilidade dos colorantes naturais obtidos nos cultivos anteriores frente à variação do pH por ácido, base e sais.

4.1 Materiais

A glicose e o glutamato monossódico (GMS) foram obtidos da LS Chemicals e da Dinâmica (São Paulo, Brasil), respectivamente. O meio de manutenção e inóculo (Batata Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura) foram obtidos da Acumedia (São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Microrganismo e preparação do inóculo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *T. amestolkiae*, cedido pela Coleção de Culturas DPUA, do laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Cadastro de Acesso no Ministério do Meio Ambiente nº A3FE0C3). Uma cultura estoque da linhagem foi mantida em tubos de ensaio contendo meio Batata Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura (BDA-YE) a 30 °C por 168 h e, posteriormente, mantidos a 4 °C. O meio BDA-YE apresentou a seguinte composição (gL⁻¹ água deionizada): ágar batata dextrose (39,0) e extrato de levedura (5,0).

Na preparação do inóculo, o fungo foi transferido da cultura estoque para o centro da placa de Petri (60 x 15 mm) contendo meio BDA-YE e mantido a 30 °C por 168 h. Todos os meios foram esterilizados a 121°C por 20 min.

4.3 Produção de colorantes em agitador rotativo

4.3.1 Avaliação da fonte de nitrogênio

Inicialmente, estudou-se a produção de colorantes naturais em agitador rotativo (New Brunswick Innova 40R, Eppendorf, Inc., USA) variando a fonte de nitrogênio. Para tanto, 5 discos de micélio de *T. amestolkiae* foram perfurados a partir do inóculo com um tubo de 8 mm de diâmetro e transferidos para 50 mL de meio de cultivo em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram incubados à 30 °C, 150 rpm por 168 h. Sulfato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio e GMS foram testados como fontes de nitrogênio em substituição às duas fontes complexas de nitrogênio: peptona de carne e extrato de carne (ZACCARIM *et al.*, 2018). O meio descrito por Zaccarim *et al.* (2018) tinha a seguinte composição (g L⁻¹ em água deionizada): glicose (30), peptona de carne (10) e extrato de carne (1,0). Posteriormente, foi avaliada uma curva de crescimento e produção de colorantes por *T. amestolkiae* cultivado na melhor condição anterior. Nesse ensaio, amostras foram retiradas em triplicata a cada 24 h a partir de 168 h de cultivo até completar 360 h, para se determinar a produção de colorantes, pH final e biomassa. Todos os meios tiveram o pH ajustado em 7,0 e, posteriormente, foram esterilizados a 121 °C por 20 min.

4.3.2 Planejamento estatísticos

Em seguida, empregou-se planejamentos estatísticos para aumentar a produção dos colorantes. Os dois primeiros planejamentos experimentais foram conduzidos utilizando 5 discos de micélio por 50 mL de meio de cultura em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL. Todos os ensaios foram realizados em agitador rotativo (New Brunswick Innova 40R, Eppendorf, Inc., USA) a 30 °C, 150 rpm por 168 h.

Primeiramente, foram realizados experimentos utilizando um planejamento fatorial 2³ completo (8 experimentos mais 3 pontos centrais) para investigar os efeitos da concentração de glicose, concentração de GMS e pH na produção de colorantes vermelhos. A partir desse planejamento fatorial, a concentração de glicose foi mantida constante a 10 g L⁻¹ e os efeitos do pH e concentração de GMS na produção de colorantes vermelhos foram avaliados por um delineamento central composto 2². Neste planejamento fatorial, um conjunto de 12 experimentos contendo uma matriz fatorial central composta com pontos

centrais e pontos axiais foram realizados. A partir dos resultados desses experimentos, as variáveis concentração de GMS e pH foram fixadas em 25 gL⁻¹ e 5,0, respectivamente. A **Tabela 1** mostra as variáveis e níveis dos fatores para ambos os desenhos experimentais.

Tabela 1. Variáveis e níveis dos fatores usados nos planejamentos experimentais utilizados para o estudo da produção de corante vermelho por cultivo submerso de *T. amestolkiae* em agitador rotativo a 30 °C, 150 rpm por 168 h.

Fatores	Níveis				
	Axial (-1.41)	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)	Axial (+1.41)
Planejamento fatorial 2³					
Glicose (gL ⁻¹)		0,0	5,0	10	
GMS (gL ⁻¹)		8,0	14	20	
pH		5,0	7,0	9,0	
Planejamento central composto 2^{2*}					
GMS (gL ⁻¹)	12,95	15	20	25	27,05
pH	2,59	3,0	4,0	5,0	5,41

*Glicose foi mantida a 10 gL⁻¹ e o tamanho do inóculo foi de 5 discos de micélio para 50 mL de meio.

Para a análise estatística, os valores reais de cada variável independente (Xi) foram codificados para fornecer níveis codificados de acordo com a equação:

$$x_i = \frac{X_i - X_o}{\Delta X_i} \quad \text{equação 2}$$

em que x_i representa o valor codificado correspondente, X_o , o valor real do ponto central e ΔX_i , o valor de cada passo.

O software “Statistica” versão 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para a análise de regressão dos dados obtidos e para estimar os coeficientes da equação de regressão. A qualidade do ajuste do modelo polinomial foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 , e sua significância estatística foi validada pelo teste F ao nível de significância (p) $\leq 0,05$; a significância dos coeficientes de regressão foi testada por um teste t .

Após fixar a concentração de glicose, GMS e o pH inicial, nas seguintes condições: 10 gL⁻¹ de glicose, 25 gL⁻¹ de GMS e pH 5,0, foi realizado um estudo para analisar o tamanho do inóculo, variando o número de discos de micélio (5,

10 e 15) por 50 mL de meio de cultivo em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL em agitador rotativo (New Brunswick Innova 40R, Eppendorf, Inc., USA) a 30 °C, 150 rpm por 168 h. Posteriormente, um planejamento Plackett-Burman para 7 variáveis foi utilizado para triagem da concentração de macro e micronutrientes (PLACKETT; BURMAN, 1946). As concentrações de sais foram determinadas com base na literatura (LEE *et al.*, 2001; LIN; DEMAIN, 1991; WEINBERG, 1990). Cada variável foi testada em dois níveis: superior (+) e inferior (-) mais 3 pontos centrais. Os níveis dos fatores para este desenho experimental estão apresentados na **Tabela 2**. A seguir, foi realizado um estudo da variação da concentração de MgSO_4 (mgL^{-1} : 6,0; 12; 24) enquanto FeSO_4 e CaCl_2 foram mantidos constantes a 10 e 15 mgL^{-1} .

Tabela 2. Variáveis e níveis dos fatores usados no planejamento Plackett-Burman utilizado para o estudo da produção de colorante vermelho por cultivo submerso de *T. amestolkiae* em agitador rotativo a 30 °C, 150 rpm por 168 h.

Fatores (mgL^{-1})	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Planejamento Plackett-Burman*			
ZnSO_4	0	5,0	10
MnSO_4	0	1,5	3,0
MgSO_4	0	3,0	6,0
FeSO_4	0	5,0	10
KCl	0	0,25	0,5
CuSO_4	0	12,5	25
CaCl_2	0	7,5	15

*Glicose, GMS e pH foram mantidos a 10 gL^{-1} , 25 gL^{-1} e 5,0, respectivamente. O tamanho do inóculo foi de 15 discos de micélio para 50 mL de meio.

4.3.3 Suplementação do meio GMS-glicose

O meio GMS-glicose definido na seção 4.3.2 foi suplementado com diversas fontes de amina provenientes de fontes complexas de nitrogênio, aminoácidos e vitaminas. Portanto, três fontes individuais de nitrogênio (extrato de levedura, extrato de carne e peptona de carne), seis aminoácidos individuais (ácido glutâmico, treonina, tirosina, glicina, cisteína e triptofano) e duas vitaminas puras (biotina e tiamina) foram adicionados separadamente ao meio GMS-glicose. O meio GMS-glicose utilizado como controle foi preparado da seguinte

forma (g L^{-1} em água deionizada): GMS (25), glicose (10), MgSO_4 (0,012), FeSO_4 (0,010), CaCl_2 (0,015). A suplementação com fontes complexas de nitrogênio foi preparada nas seguintes concentrações (g L^{-1} em água deionizada): extrato de levedura (0,5 e 2,0), extrato de carne (0,5 e 1,0), peptona de carne (0,5). A suplementação com aminoácidos (ácido glutâmico, treonina, tirosina, glicina, cisteína e triptofano) foi fornecida na seguinte concentração: $0,7 \text{ g L}^{-1}$ (JUNG *et al.*, 2003) e para as vitaminas (biotina e tiamina) a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (ATKIN *et al.*, 1944). Para este estudo, 30 discos de micélio (8 mm de diâmetro) de *T. amestolkiae* foram perfurados do inóculo e transferidos para 100 mL de meio de cultivo contido em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL. O cultivo submerso foi realizado em agitador rotativo (New Brunswick Innova 40R, Eppendorf, Inc., USA) por 168 h a 150 rpm e 30°C . Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,0 e, posteriormente, foram esterilizados a 121°C por 20 min.

4.3.4 Avaliação do crescimento do microrganismo e reologia do caldo de cultivo

Para avaliar os efeitos da natureza da fonte de nitrogênio na produção do colorante vermelho e os efeitos da morfologia celular na reologia do caldo de cultivo, cultivos de *T. amestolkiae* foram monitorados por 168 h, e as amostras retiradas a cada 24 h em triplicata. Os meios de cultivo analisados foram: meio contendo fonte complexa de nitrogênio e meio GMS-glicose. O inóculo foi preparado como descrito anteriormente na seção 4.2. O meio contendo fonte complexa de nitrogênio foi o mesmo descrito por Zaccarim *et al.* (2018) e está descrito na seção 4.3.1. O meio GMS-glicose está descrito na seção 4.3.3. Os valores de pH dos meios GMS-glicose e fonte complexa de nitrogênio foram ajustados para 5,0 e 7,0, respectivamente, e, posteriormente, foram esterilizados a 121°C por 20 min.

4.4 Cultivos em biorreator tanque agitado

Foram realizados ensaios em biorreator Minifors II (INFORS, New Jersey/USA) com volume útil de 4 L (**Figura 8**). As seguintes condições de cultivos foram mantidas constantes: meio de cultivo GMS-glicose, temperatura de 30°C , frequência de agitação a 100 rpm e pH ajustado para 5,0, ao longo de todo o processo através da adição de NaOH e/ou H_2SO_4 (1,0 M). O controle de formação de espuma foi realizado com antiespumante de emulsão de simeticona

30 % (m/v) GRAU USP (DOWN CORNING®). Foram empregados dois tipos de impelidores: duas turbinas de seis pás planas (turbinas Rushton) e dois impelidores do tipo orelha de elefante submersos no líquido foram colocados a 14 cm e 9,0 cm de distância um do outro, respectivamente. Os dois impelidores do tipo orelha de elefante foram configurados nos modos descendente-ascendente.

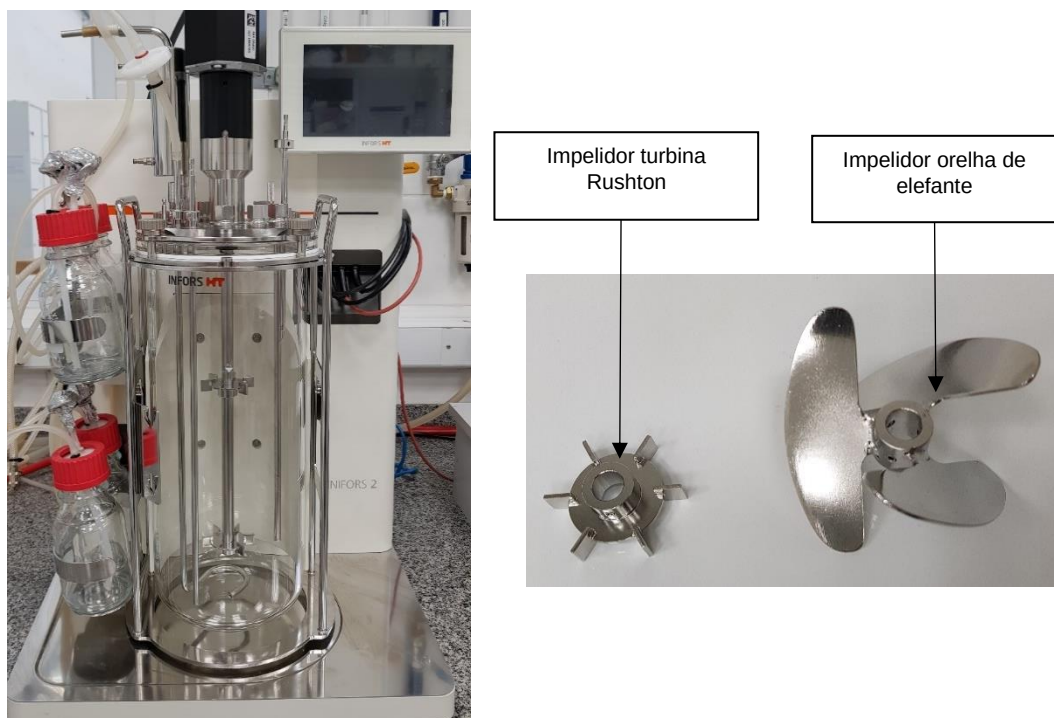


Figura 8. Biorreator Minifors II (INFORS, New Jersey/USA) e impelidores empregados nos cultivos de aumento de escala para produção de colorantes naturais por *T. amestolkiae*.

A unidade de controle permitiu o monitoramento *on-line* de parâmetros de processo, como vazão de gases, tensão de oxigênio dissolvido em relação à saturação com o ar, pH, temperatura e frequência de rotação. O controle dos parâmetros listados era automatizado e a adição de ácido, base e antiespumante, por bombas peristálticas, foram registrados por volume. A temperatura foi mantida em 30 °C por meio de camisa de aquecimento do vaso do reator e de um banho termostático conectado ao condensador. Uma sonda eletroquímica de oxigênio dissolvido (Oxyferm FDA 120, Hamilton, Suíça), calibrada no meio de cultivo após sua esterilização em 0 % (ligando o fluxo de

nitrogênio) e em 100 % quando o meio estava totalmente saturado com oxigênio do ar, permitiu o controle das concentrações de oxigênio dissolvido no meio (OD), expresso em percentual de saturação. Na **Figura 9** está representado o diagrama esquemático dos experimentos realizados em biorreator.

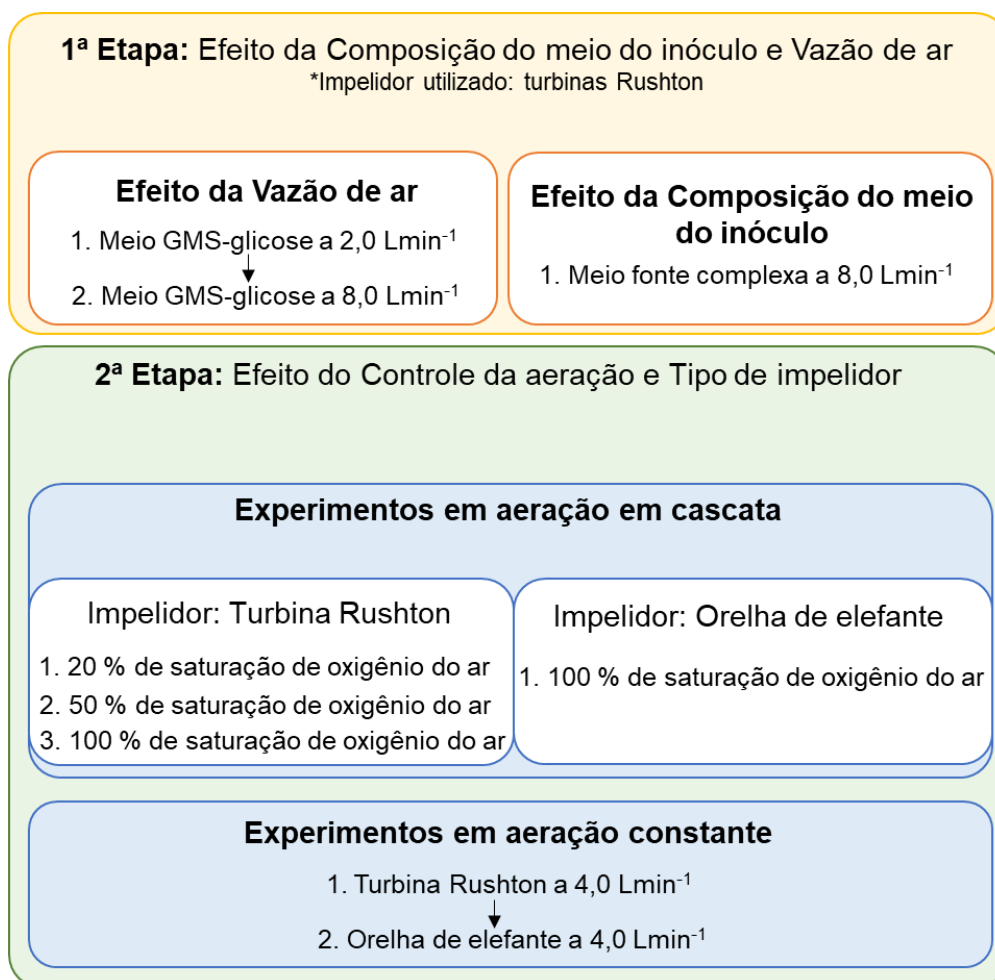


Figura 9. Diagrama esquemático dos ensaios de avaliação da produção de colorantes naturais por *T. amestolkiae* em biorreator tanque agitado.

A etapa de produção em biorreator consistiu em três etapas: pré-inóculo, inóculo e cultivo. As amostras foram retiradas a cada 24 h até o fim dos cultivos. O pré-inóculo foi realizado em placa BDA-YE nas mesmas condições descritas na seção 4.2 e a quantidade de discos de micélio inoculados variou de acordo com cada batelada. Um total de 3,6 L de meio de cultivo foi adicionado ao vaso do biorreator e esterilizado a 121 °C por 30 min. Após a esterilização, 400 mL do inóculo foram adicionados ao vaso do biorreator. O volume do inóculo foi de 10 % (v/v) do meio de cultivo contido no biorreator e a composição variou de acordo

com o experimento. Todos os experimentos foram realizados utilizando o meio GMS-glicose como meio de cultivo.

Na primeira etapa dos experimentos, dois meios de cultura foram testados no inóculo: meio GMS-glicose e meio de fonte complexa de nitrogênio (o mesmo usado para o experimento que se avaliou o crescimento do fungo, descrito na seção 4.3.4). Aos meios de cultura dos inóculos foram inoculados 30 discos de micélio *T. amestolkiae* por 100 mL de meio. Todos os experimentos foram realizados utilizando o meio GMS-glicose como meio de cultivo e as turbinas Rushton como impelidores.

No primeiro conjunto dos experimentos da primeira etapa, a composição do meio de cultura do inóculo foi a mesma do meio de cultura do biorreator (meio GMS-glicose incubado a 30 °C, 150 rpm por 24 h), e os efeitos da vazão de ar (2,0 e 8,0 Lmin⁻¹) foram avaliados. No segundo conjunto de experimentos, a composição do meio de cultura do inóculo foi o meio contendo fonte complexa de nitrogênio (incubado a 30 °C, 150 rpm por 48 h). A vazão de ar foi fixada em 8,0 Lmin⁻¹. Nesta etapa fixou-se o inóculo de fonte complexa de nitrogênio para os próximos experimentos.

Na segunda etapa dos experimentos, uma estratégia de controle de aeração (aeração em cascata e aeração constante) e tipo de impelidor (turbina Rushton e orelha de elefante) foram avaliados. Para tanto, 45 discos de micélio de *T. amestolkiae* foram perfurados do pré-inóculo e transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de fonte complexa de nitrogênio. No primeiro conjunto de experimentos da segunda etapa, foram avaliados os efeitos de oxigênio dissolvido na produção de colorante vermelho. Uma estratégia de controle de vazão de ar em cascata foi empregada, isto é, o controle de oxigênio dissolvido (OD) foi realizado em cascata com a vazão de ar, com o PID definido de 0,5 a 8,0 Lmin⁻¹ para o estudo da variação da vazão de ar. O nível de OD foi fixado em 20, 50 e 100 % de saturação de oxigênio do ar. Os impelidores utilizados nessa etapa foram as turbinas Rushton. Como em controle de aeração em cascata, a vazão de ar varia significativamente, e devido a problemas técnicos na melhor condição para a produção de colorante vermelho (OD fixado a 100 % de saturação de oxigênio do ar), este cultivo foi realizado em duplicata para avaliar a reprodutibilidade nos rendimentos de colorantes vermelhos. Posteriormente, os impelidores orelha de elefante foram utilizados

para avaliar o controle de aeração em cascata com OD fixado em 100 %. No segundo conjunto de experimentos, os cultivos foram operados em vazão de ar constante, fixando a aeração em 4,0 Lmin⁻¹, para avaliar o efeito do tipo de impelidor (turbina Rushton e orelha de elefante) na produção de corante vermelho.

Amostras foram retiradas a cada 24 h durante os cultivos para qualificar a morfologia e medir a produção de corante vermelho e a concentração de glicose. Ao final de cada cultivo, o caldo de cultivo foi utilizado para medir a viscosidade aparente. Posteriormente, o caldo de cultivo restante foi filtrado usando um papel filtro de 80 gm² (Whatman, Reino Unido) e, em seguida, usando um filtro de 0,45 µm adquirido da Millipore (Bedford, MA, EUA). O meio fermentado filtrado foi utilizado para obter valores finais de produção de corante vermelho e concentração de glicose, enquanto a biomassa retida no papel filtro foi utilizada para determinar o crescimento final do microrganismo.

4.5 Estudo de estabilidade da cor em diferentes valores de pH e na presença de sais

Para estudar a ação do pH nos colorantes produzidos por *T. amestolkiae*, foi adicionado ácido/base e sais (K₃PO₄ e MnSO₄) ao meio fermentado. Para avaliar a mudança de cor por ação de ácido/base, alíquotas de 10 mL do meio fermentado (Absorbância inicial de 16,26 UA_{500nm}) foram adicionadas a um tubo de ensaio estéril e, então, adicionou-se lentamente NaOH (1,0 M) ou HCl (1,0 M) até atingir o valor de pH desejado. A absorbância inicial destes ensaios foi proveniente de cultivos em agitador rotativo empregando maior número de discos de micélio (dados não apresentados). Os valores de pH estudados foram 1,0; 3,0; 7,0; 9,0; 11 e 13, e nos cálculos levou-se em consideração a variação do volume. Nos estudos de reversibilidade da cor, procedeu-se da mesma maneira. Todos os experimentos foram incubados em banho termorregulado a 25 °C e amostras foram retiradas nos tempos de 0, 1, 2, 3, 12 e 24 h de incubação para monitorar a mudança de cor.

Para avaliar a mudança de cor por ação de sais, alíquotas do meio fermentado (Absorbância inicial de 16,26 UA_{500nm}) foram adicionadas a um tubo de ensaio estéril e então adicionou-se 15 e 30 % (m/m) de K₃PO₄ ou MnSO₄ para uma massa final total de 10 g. Todos os experimentos foram incubados em

banho termorregulado a 25 °C e mudanças efetivas de cor foram monitoradas após 24 h de incubação.

4.6 Métodos analíticos

A concentração de biomassa foi calculada com a massa seca do micélio por secagem do material obtido, após filtração à vácuo em papel de filtro previamente seco e pesado, em estufa a 100 °C por 24 horas. Na análise da concentração de glicose, alíquotas de 20 µL de meio fermentado filtrado através de filtro de 0,45 µm (Millipore) foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) (Shimadzu - LC 20AD) utilizando coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) e eluídas em fase móvel composta de H₂SO₄ 0,005 molL⁻¹ nas seguintes condições cromatográficas: temperatura de injeção de 60 °C, vazão de 0,6 mLmin⁻¹ em sistema de HPLC equipado com um detector RID (modelo Shimadzu RID – 20 A). Cada análise foi realizada em triplicata.

O teor de colorantes extracelulares foi estimado por análise espectrofotométrica a partir da leitura da absorbância do sobrenadante a 410, 470 e 500 nm após uma varredura de espectro do meio fermentado (**Figura S1 do Material Suplementar**), que corresponde à absorbância máxima para colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. A medição foi realizada utilizando o espectrofotômetro EnSpire Alpha Plate Reader (PerkinElmer®) e considerando o fator de diluição de cada amostra. Os resultados foram expressos em Unidades de Absorbância (UA). Embora o objetivo deste trabalho tenha sido a produção do colorante vermelho, também foi determinada a produção de colorantes amarelo e laranja. Os resultados dos colorantes amarelo e laranja foram expressos em termos do colorante vermelho em relação ao amarelo (V/A) e do colorante vermelho em relação ao laranja (V/L), de acordo com as equações 3 e 4 respectivamente.

$$\frac{V}{A} = \frac{Abs_{Vermelho}}{Abs_{Amarelo}} \quad \text{equação 3}$$

$$\frac{V}{L} = \frac{Abs_{Vermelho}}{Abs_{Laranja}} \quad \text{equação 4}$$

onde $Abs_{Vermelho}$, $Abs_{Amarelo}$ e $Abs_{Laranja}$ representam, respectivamente, a absorbância dos colorantes vermelho, amarelo e laranja.

4.6.1 Análise colorimétrica

O meio fermentado contendo os colorantes foi caracterizado em termos de descrição quantitativa da cor. As coordenadas de cor L^* , a^* e b^* foram medidas em colorímetro (Hunterlab ColorQuest, XE) com o sistema de cores CIELAB (CLYDESDALE, 1991). Estes valores foram utilizados para calcular os valores de croma (C^*) e ângulo de matiz (H°). L^* indica luminosidade e varia de 0 (preto) a 100 (branco). Positivos e negativos em a^* representam vermelho e verde, respectivamente, enquanto positivos e negativos em b^* representam amarelo e azul, respectivamente. Valores de croma denotam a saturação ou pureza da cor. Valores próximos ao centro com o mesmo valor L^* indicam cores opacas ou cinza, enquanto valores próximos à circunferência representam cores vivas ou brilhantes. Os valores do ângulo de matiz representam 0 para vermelho, 90 para amarelo, 180 para verde e 270 para azul. Os parâmetros de cor do sistema CIELCH são obtidas matematicamente a partir dos cálculos de croma (C^*) e ângulo de matiz (H°) por meio das equações 5 e 6, respectivamente.

$$C = \sqrt{\frac{a^2}{b^2}} \quad \text{equação 5}$$

$$H^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{equação 6}$$

onde $\arctan$ representa a função inversa da tangente ou arco tangente (também chamado de tangente inversa) e pode ser representado por $\tan^{-1}$ ou $\arctan$.

4.6.2 Análise de fluorescência

Para saber se os colorantes presentes no meio fermentado emitiam fluorescência, um espectro completo de fluorescência 3D foi determinado a 25 °C com uma faixa de comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) variando de 220-600 nm com uma largura de feixe de 2 nm e comprimentos de onda de emissão (λ_{em}) de 370-650 nm com uma largura de feixe de 1 nm em espectrofluorímetro RF-6000 SHIMADZU. Os padrões de espectroscopia de fluorescência 3D no λ_{ex}

ou λ_{em} máximos de cada fluoróforo foram atribuídos a cada colorante específico com base na comparação com os padrões descritos na literatura. No entanto, alguns padrões de comprimento de onda de excitação/emissão encontrados no meio fermentado não puderam ser atribuídos a um colorante específico, já que seus padrões de fluorescência podem apresentar múltiplas identificações possíveis. Em todos os estudos usou-se água ultra pura como meio de diluição. Os resultados foram expressos em termos de Unidades de Fluorescência (UF).

4.6.3 Estudo da reologia do caldo de fermentação e microscopia

A viscosidade aparente (η_a) foi medida utilizando um reômetro digital (DVIII Ultra, Brookfield Engineering Laboratories) e foi caracterizada pelo modelo descrito nas equações 7 e 8. Onde τ e $\dot{\gamma}$ representam a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, respectivamente. As constantes, K e n representam o índice de consistência e o índice de comportamento de escoamento, respectivamente.

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad \text{equação 7}$$

$$\eta_a = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{equação 8}$$

As características macromorfológicas da biomassa de *T. amestolkiae* foram observadas em um microscópio de campo claro (Leica ICC 50 HD, Heerburg, Suíça) para qualificar a morfologia das células. Por uma câmera digital, as imagens foram tiradas, utilizando o software Leica Suite LAS EZ.

4.6.4 Estudo hidrodinâmico

A medição do k_La foi realizada sem o microrganismo e no final de cada cultivo de aeração constante, empregando o método dinâmico descrito por Bareither *et al.* (2013). O OD foi medido por sensor polarográfico com tempo de resposta < 60 s a 25°C, segundo o fabricante (Oxyferm FDA 120, Hamilton, Suíça). O sensor de OD foi colocado na base do biorreator e teve tempo de resposta a cada 1 segundo. Depois que o nível de OD atingiu a saturação de oxigênio, o fluxo de nitrogênio foi ligado. Quando a leitura do OD caiu abaixo de 5 %, o fluxo de nitrogênio foi interrompido. Os experimentos foram realizados a 100 rpm e 30 °C e variou-se a taxa de aeração. Quando o OD% aumentou mais

de 90 %, o experimento foi concluído. O k_La foi determinado com base na equação 9:

$$\ln(OD\%,_{sat} - OD\%) = -k_La * t + A \quad \text{equação 9}$$

onde $OD\%,_{sat}$ é oxigênio dissolvido saturado; t é o tempo; A é um coeficiente; $-k_La$ é a inclinação de $\ln(OD\%,_{sat} - OD\%)$ versus o tempo usando regressão linear de $OD\%$ entre 20 % e 80 %.

Resultados e Discussão

5.1 Produção de colorantes em agitador rotativo

5.1.1 Avaliação da fonte de nitrogênio

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, utilizou-se fontes complexas de nitrogênio (peptona de carne e extrato de carne), as quais foram eficientes para o crescimento de *T. amestolkiae* e produção de colorantes em agitador rotativo (ZACCARIM *et al.*, 2018). A produção máxima do colorante vermelho na referida pesquisa foi de 4,61 UA_{490nm}, nas seguintes condições (g L⁻¹): glicose (30), extrato de carne (1,0) e peptona de carne (10), pH 7,0. No entanto, o crescimento elevado do microrganismo em fontes complexas acarreta problemas de escalonamento de produção, o que pode gerar caldos de cultivo viscosos e afetar o padrão de mistura e os processos de transferência de massa e temperatura (BLANCH; BHAVARAJU, 1976). Ademais, fontes complexas de nitrogênio induzem a produção de colorantes majoritariamente intracelulares, apresentando baixa taxa de excreção (LIN; DEMAINE, 1991).

Considerando que a literatura relata que os cultivos com glicose e fontes não complexas de nitrogênio, incluindo o GMS, não são tão favoráveis ao crescimento quanto às complexas e favorecem a produção de colorante vermelho solúvel em água (LIN; DEMAINE, 1994), neste estudo procurou-se fontes de nitrogênio que induzissem a rota sintética de colorantes vermelhos extracelulares em condições de baixo crescimento. Desta maneira, em substituição às fontes complexas de nitrogênio (peptona de carne e extrato de carne), avaliou-se o sulfato e nitrato de amônio, nitrato de sódio e GMS como fontes de nitrogênio e empregando glicose como fonte de carbono. Os efeitos de cada fonte de nitrogênio no crescimento do microrganismo, consumo de glicose, produção de colorantes e pH final dos cultivos estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Avaliação da fonte de nitrogênio para o estudo da produção de colorantes amarelo, laranja e vermelho por *T. amestolkiae*, consumo de glicose, biomassa e pH final. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.

Fonte de nitrogênio	Consumo de glicose (%) [†]	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Colorante amarelo (UA _{410nm})	Colorante laranja (UA _{470nm})	Colorante vermelho (UA _{500nm})
Sulfato amônio	8,29 ± 0,02	2,98 ± 0,12	3,45 ± 0,08	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Nitrato amônio	10,51 ± 0,08	2,83 ± 0,10	3,54 ± 0,07	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Nitrato de sódio	2,39 ± 0,03	2,69 ± 0,29	4,52 ± 0,05	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,00
GMS	1,12 ± 0,11	0,00 ± 0,00	5,16 ± 0,03	0,40 ± 0,04	0,35 ± 0,00	0,39 ± 0,01
Fonte complexa [‡]	99,76 ± 0,01	16,34 ± 0,95	6,32 ± 0,64	17,35 ± 1,72	18,37 ± 1,79	25,42 ± 2,79

A relação C:N foi mantida em 15, exceto para o meio com fonte de nitrogênio complexa que foi composto de (g L⁻¹): glicose (30) peptona de carne (10) e extrato de carne (1,0). Todos os meios tiveram o pH ajustado para 7,0;

[†]O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

[‡]Condições reportadas por (ZACCARIM *et al.*, 2018);

Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Todas as fontes de nitrogênio estudadas promoveram baixo crescimento do microrganismo em relação à concentração de biomassa obtida com peptona e extrato de carne. As fontes de amônio limitaram tanto o crescimento quanto a produção de colorantes. Apesar de a literatura reportar que a assimilação de amônia é importante para a produção de colorantes por fungos filamentosos, incluindo espécies do gênero *Penicillium* e *Monascus* (ARAI *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2015), essa fonte de nitrogênio teve um efeito negativo na produção de colorantes por *T. amestolkiae*, além de promover a produção de compostos ácidos que levaram a redução do pH do meio de cultivo. O consumo de glicose nesses experimentos também foi baixo sendo que, aproximadamente, 90 % da glicose permaneceu no meio. Assim, pode-se concluir que, para essa cepa, a amônia não induz a produção de colorante.

O nitrato de sódio também não favoreceu o crescimento celular e a produção de colorantes naturais. Já o meio com GMS foi o único que apresentou uma pequena produção de colorantes excretados, em torno de 0,39 AU_{500nm}, associado à ausência de crescimento celular, o que é notavelmente interessante considerando que o objetivo principal é alcançar uma alta produção de colorantes extracelulares em velocidades de crescimento mais baixas. Nesse sentido, é possível que a produção do colorante vermelho seja orientada de acordo com a fonte de nitrogênio utilizada.

O efeito do GMS na concentração de biomassa provavelmente está associado à via biossintética dos colorantes de *T. amestolkiae*. O GMS parece contribuir para o alto rendimento de colorantes suprimindo o metabolismo central

do carbono e redirecionando o carbono para a via de biossíntese dos colorantes. Além disso, a maior parte do colorante produzido no meio com GMS foi extracelular. Até o presente momento, pouco se sabe sobre as reações biossintéticas e os genes envolvidos na produção das azafilonas. No entanto, há evidências de que pelo menos uma, e possivelmente duas, policetídeos sintases estejam envolvidas na biossíntese, e ainda que, ácidos graxos são possíveis precursores dos colorantes formados (CHEN *et al.*, 2017b; YANG *et al.*, 2015b).

A via hipotética de biossíntese envolve a formação de um cromóforo hexacetídeo de azafilona e, posterior, condensação com um β -cetoácido, reações catalisadas por policetídeo sintases (PKS). O β -cetoácido é ligado à estrutura do cromóforo por uma reação de transesterificação para gerar os colorantes laranjas monascorubrina e rubropunctatina. A redução dos colorantes laranjas dão origem aos amarelos ankaflavina e monascina. Por conseguinte, os colorantes vermelhos são formados quimicamente a partir dos laranjas por aminação através de uma base de *Schiff* dando origem à monascorubramina e rubropunctamina (HAJJAJ *et al.*, 1997). As mesmas cores existem em duas estruturas moleculares diferindo no comprimento das cadeias alifáticas e são produzidas, principalmente, como colorantes intracelulares com baixa solubilidade em água (WONG; KOEHLER, 1983). Quando determinados grupamentos amina estão presentes no meio de cultivo, reações envolvendo os colorantes contendo grupos aminofílicos e os grupamentos amina mudam a localização dos colorantes vermelhos predominantemente ligados à célula para o meio extracelular (SHAH *et al.*, 2014). Portanto, a fonte de nitrogênio ou a presença de aminoácidos é importante na produção de colorantes vermelhos.

Os aminoácidos são precursores da cadeia lateral dos colorantes vermelhos solúveis, pois levam à formação de um complexo colorante-glutamato pela inserção do GMS no cromóforo, substituindo o oxigênio piranóide. Isso ocorre devido a afinidade do núcleo 4H-pirano em sofrer substituição por aminas primárias para formar as correspondentes γ -piridonas vinílicas (HAJJAJ *et al.*, 2000b; LIN; DEMAINE, 1991; WEI; YAO, 2005). Lin *et al.* (1992) comprovaram a formação do complexo glutamato-colorante através de reações de semi-síntese entre o glutamato e o colorante laranja insolúvel monascorubrina. Os colorantes vermelhos (rubropunctamina e monascorubramina) têm um radical -NH no anel em vez do nitrogênio do glutamato e são 500 vezes menos solúveis em água

(LIN *et al.*, 1992). Portanto, a liberação desses colorantes hidrofóbicos primários depende das fontes específicas de amino para estimular a produção e excreção de colorante vermelho.

A partir desses resultados, pode-se concluir que quando o GMS está presente no meio, o metabolismo de produção de metabólitos secundários é favorecido em relação ao metabolismo de crescimento. Isso é facilitado uma vez que a inserção de GMS no cromóforo aumenta a solubilidade do colorante vermelho, fazendo com que esse seja solúvel em água, o que facilita sua excreção para o meio extracelular (EVANS; WANG, 1984). Portanto, o processo de produção incluindo GMS no meio de cultivo se torna uma vantagem por diminuir etapas de extração, já que não é necessária uma etapa de rompimento celular/ extração para a obtenção dos colorantes intracelulares.

A próxima etapa do trabalho foi avaliar a produção de colorante vermelho ao longo de 360 h utilizando o mesmo meio de cultivo com GMS apresentado na **Tabela 3**. Os resultados estão representados na **Figura 10**.

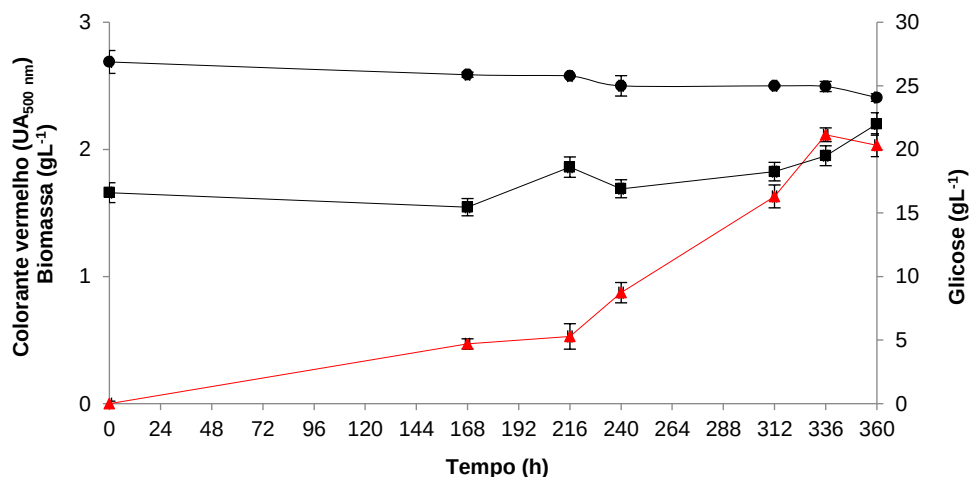


Figura 10. Produção de colorante vermelho (▲), biomassa (■) e consumo de glicose (●) durante a fermentação de *T. amestolkiae* em agitador rotativo utilizando glicose e GMS. Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

A produção de colorantes vermelhos atingiu 0,47 UA_{500nm} às 168 h e depois aumentou em torno de 4 vezes após 360 h de cultivo, sendo que o crescimento celular não aumentou significativamente após 168 h de cultivo. A máxima produção de colorantes (2,12 UA_{500nm}) ocorreu após 336 h de cultivo

com uma baixa taxa de consumo de glicose e formação de biomassa. Embora a produção máxima de colorantes tenha sido alcançada em 336 h, o consumo de glicose foi apenas 3 % maior do que em 168 h, o que mostra que ajustes em outros parâmetros, tais como a concentração dos nutrientes do meio de cultivo e o pH inicial, poderiam aumentar o consumo de glicose e a produção de colorante vermelho após 168 h de fermentação. Além disso, 336 h é um longo período para produção de bioprodutos industrialmente, considerando, entre outros fatores, o consumo de energia. Desta maneira, todos os cultivos posteriores foram realizados ao longo de 168 h, porém, variando concentração de glicose, concentração de GMS e pH inicial.

5.1.2 Planejamentos fatoriais

Os experimentos preliminares mencionados no item 5.1.1 mostraram o potencial do GMS como fonte de nitrogênio para produzir colorantes naturais por *T. amestolkiae*. Objetivando-se aumentar a produção de colorantes, planejamentos fatoriais foram conduzidos do seguinte modo: i) planejamento fatorial 2^3 avaliando as variáveis independentes concentração de glicose, concentração de GMS e pH inicial e ii) planejamento central composto 2^2 avaliando as variáveis independentes concentração de GMS e pH inicial. A variável resposta para estes planejamentos foi a produção de colorante vermelho, pois essa molécula é a que tem mais interesse industrial. Porém, também foram determinados outros parâmetros, tais como, pH final, biomassa, consumo de glicose, relação vermelho/amarelo (V/A) e vermelho/laranja (V/L). Os resultados para o planejamento fatorial 2^3 estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para o estudo da produção de corante vermelho por cultivo submerso de *T. amestolkiae*. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.

Ensaio	pH	Glicose (gL ⁻¹)	GMS (gL ⁻¹)	Colorante vermelho (UA _{500nm})	pH final	Biomassa (gL ⁻¹)	Consumo de glicose (%) [†]	V/A [‡]	V/L [§]
1	5	0	8	0,04	7,77	0,00	0,00	0,27	0,82
2	9	0	8	0,05	8,88	0,00	0,00	0,79	0,96
3	5	10	8	0,88	5,26	0,00	6,53	1,12	1,08
4	9	10	8	0,03	8,64	0,00	17,83	0,53	0,89
5	5	0	20	0,77	7,08	0,00	0,00	1,13	1,21
6	9	0	20	0,06	8,75	0,12	0,00	0,81	0,95
7	5	10	20	1,67	5,11	0,80	28,81	1,21	1,25
8	9	10	20	0,05	8,74	0,27	27,67	0,65	0,93
9-11 (C)	7	5	14	0,37 ± 0,01	5,55 ± 0,00	0,38 ± 0,01	30,76 ± 0,31	0,84 ± 0,05	1,03 ± 0,01

C – Pontos centrais;

[†]O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

[‡]Relação corante vermelho/amarelo; [§]Relação corante vermelho/laranja.

Os valores de pH final foram afetados por mudanças na concentração inicial de glicose. Na ausência de glicose, os cultivos que tinham o pH inicial de 5,0 finalizaram com valores de pH próximos a 7,0 (ensaios 1 e 5, **Tabela 4**). Na presença de glicose, o pH diminuiu de 7,0 para 5,5 (ensaios 9(C), **Tabela 4**). Existe uma relação intrínseca entre glicose e o pH para o desenvolvimento celular e provavelmente a metabolização da glicose levou à diminuição do pH do meio, pois pode ter ocorrido a produção de ácidos orgânicos e outras moléculas com características ácidas. Esse padrão também foi observado nos cultivos com fontes complexas de nitrogênio empregando glicose como fonte de carbono (ZACCARIM *et al.*, 2018). Como ocorreu nos experimentos do item 5.1.1, o crescimento do microrganismo foi baixo (< 1,0 gL⁻¹). As relações entre V/A e V/L mostraram que os colorantes laranja e amarelo foram os principais componentes produzidos em quase todas as condições experimentais.

O perfil de crescimento indica que não houve relação positiva entre biomassa e glicose, uma vez que o GMS pode servir tanto como fonte de carbono quanto de nitrogênio. No entanto, a presença de glicose é bastante importante, pois nas condições sem esse composto não houve produção de colorantes (Ensaios 1, 2, 5 e 6, **Tabela 4**). Uma característica distinta do metabolismo secundário é sua associação com a estabilidade do crescimento. Portanto, o metabolismo secundário é frequentemente provocado pela exaustão de um nutriente ou adição de um indutor e/ou por uma diminuição da taxa de crescimento (BIBB, 2005). Esses eventos geram sinais que causam uma cascata de eventos regulatórios resultando em diferenciação química (metabolismo secundário) e morfológica (morfogênese) dos produtores de metabólitos

secundários (KRAIRAK *et al.*, 2000). Parece que em *T. amestolkiae*, a atividade de genes catabólicos de carboidratos ou *operons* é regulada na hierarquia de utilização de carboidratos para o metabolismo de biossíntese de colorantes em detrimento ao crescimento. Esse resultado é bastante interessante, pois em um processo de fermentação em larga escala, o crescimento celular e a morfologia de fungos filamentosos muitas vezes causam alta viscosidade do meio de fermentação, o que pode resultar em problemas ao processo (dificuldades de mistura, transferência insuficiente de massa e oxigênio, alta exigência de energia e formação de zonas de concentração de nutrientes), afetando diretamente a produtividade e excreção de diferentes metabólitos microbianos (BLANCH; BHAVARAJU, 1976). Nesse sentido, muitos esforços têm sido feitos para alterar o crescimento e a morfologia fúngica, a fim de reduzir a viscosidade do caldo (LV *et al.*, 2017). Portanto, um meio de cultivo que promove a produção de bioprodutos com baixo crescimento de microrganismos é uma vantagem.

Os efeitos dos parâmetros independentes do 2³ planejamento fatorial e suas interações estão representados no gráfico de Pareto (**Figura 11.A**). O gráfico de Pareto consiste em barras com um comprimento proporcional ao valor absoluto dos efeitos estimados divididos pelo erro padrão. As barras são exibidas na ordem do tamanho dos efeitos, com os maiores efeitos no topo. O gráfico inclui uma linha vertical no valor *t* crítico para um *p* de 0,05 (STOWE; MAYER, 1966). Os efeitos para os quais as barras são menores que o valor *t* crítico são considerados não significativos e não afetam a variável resposta. Para a produção de corante vermelho, o pH apresentou um nível de confiança acima de 95 %. Para este estudo, o pH foi considerado a única variável significativa na produção de corante vermelho, com um efeito negativo, o que significa que níveis mais baixos desse parâmetro podem promover aumento na produção de corante vermelho. O ajuste da regressão foi verificado pelo coeficiente de determinação, R^2 , que foi de 0,981, indicando que apenas 1,9 % da variação total não pôde ser explicada pelo modelo.

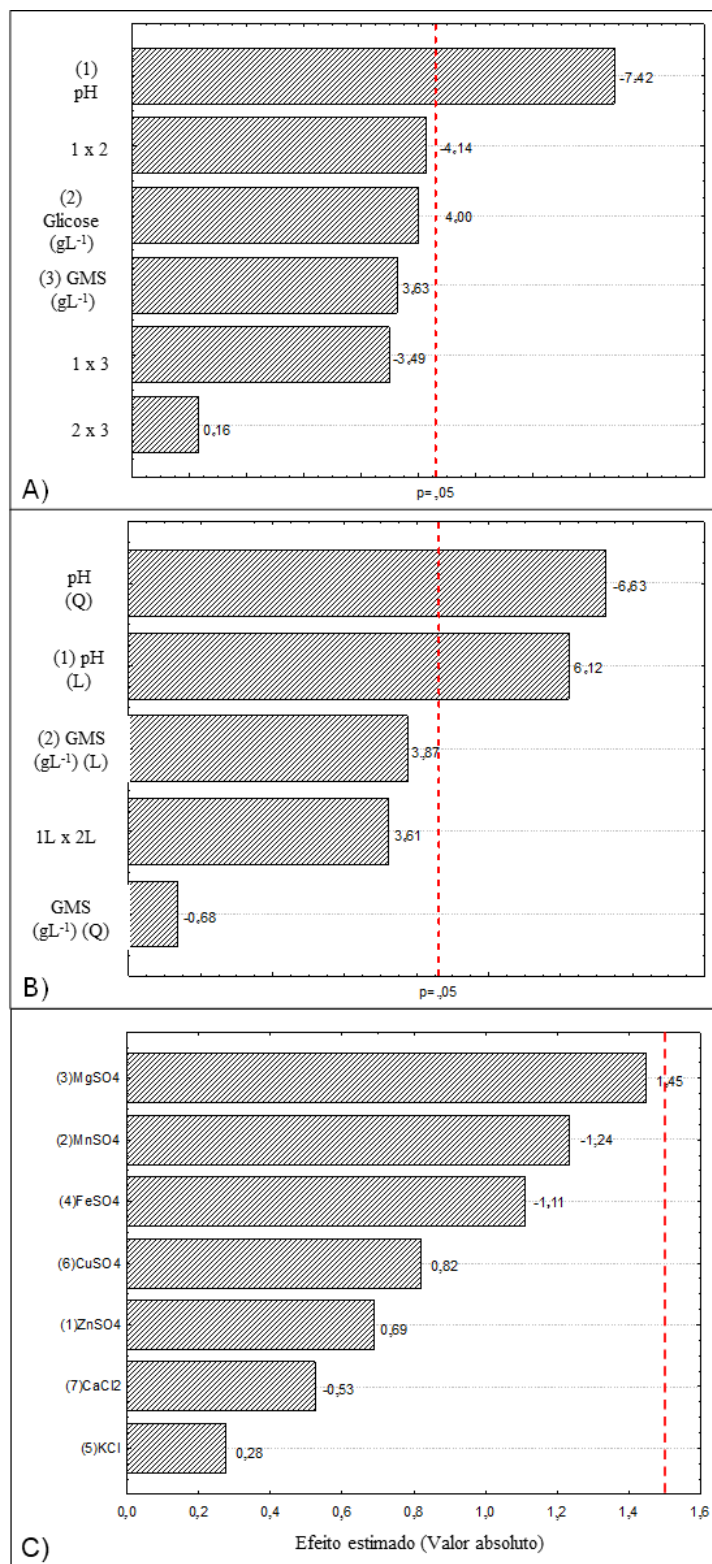


Figura 11. Gráfico de Pareto para os planejamentos: planejamento fatorial 2^3 **(A)**, planejamento fatorial 2^2 **(B)**, planejamento Plackett-Burman **(C)** para o estudo da produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* em agitador rotativo. A linha no gráfico representa uma linha de referência, qualquer fator que ultrapasse essa linha tem efeito significativo no valor de $p < 0,05$.

O pH inicial que promoveu a maior produção de corante vermelho (1,67 UA_{500nm}) foi de 5,0 (ensaio 7, **Tabela 4**) sob concentrações máximas de glicose e GMS. Embora o consumo de glicose tenha sido menor que 70 %, optou-se por manter o nível mais alto (10 gL⁻¹) nos experimentos posteriores, pois o estresse osmótico causado por altas concentrações de glicose, juntamente com GMS, pode desviar a rota metabólica do fungo para a síntese dos corantes. Esses resultados corroboram com os resultados reportados por Hajjaj *et al.* (1997), que mostraram que *Monascus* pode produzir altos níveis de corante vermelho extracelular quando crescido em meio de cultivo quimicamente definido com excesso de glicose e GMS. Assim, para o planejamento experimental 2² avaliou-se valores de pH inferiores a 5,0 e maiores concentrações de GMS.

Na **Figura 11.B** está apresentado o gráfico de Pareto para o 2² planejamento experimental mostrando os efeitos estimados das variáveis e suas interações em ordem decrescente de magnitude. As variáveis independentes mais relevantes foram aquelas relacionadas ao pH nos níveis linear e quadrático. Para o nível linear, o planejamento fatorial mostrou que o maior valor de pH foi melhor para se obter o corante vermelho. Os resultados da produção de corante vermelho, pH final, biomassa, consumo de glicose e relações entre vermelho/amarelo (V/A) e vermelho/laranja (V/L) para o planejamento 2² composto central estão representados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Matriz do planejamento central composto 2² para o estudo da produção de corante vermelho por *T. amestolkiae*. A concentração de glicose utilizada para estes cultivos foi de 10 gL⁻¹ e variou-se o pH inicial e a concentração de GMS. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.

Ensaio	pH	GMS (gL ⁻¹)	Corante vermelho (UA _{500nm})	pH final	Biomassa (gL ⁻¹)	Consumo de glicose (%)†	V/A‡	V/L§
1	3	15	0,30	2,99	0,78	10,50	1,28	1,23
2	3	25	0,42	2,80	0,77	16,95	1,31	1,25
3	5	15	0,90	4,72	0,63	7,36	1,03	1,14
4	5	25	2,88	4,94	1,04	17,85	1,22	1,28
5	2,59	20	0,08	2,34	0,95	11,58	0,67	1,00
6	5,41	20	1,07	5,11	0,84	26,75	1,08	1,17
7	4	12,95	1,61	4,13	0,60	14,14	1,28	1,24
8	4	27,05	2,12	4,16	1,31	25,84	1,43	1,33
9-11 (C)	4	20	2,11 ± 0,09	3,79 ± 0,00	0,82 ± 0,15	18,67 ± 1,03	1,44 ± 0,01	1,32 ± 0,00

C - Pontos centrais;

†O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

‡Relação corante vermelho/amarelo; §Relação corante vermelho/laranja.

Neste planejamento objetivou-se estudar valores mais baixos de pH inicial (2,59 a 5,41) combinados com maiores concentrações de GMS, a um máximo de 27,05 gL⁻¹ (**Tabela 5**). Sob condições extremas de pH ácido, ocorreram mudanças no perfil dos colorantes produzidos. A faixa de pH de 4,0 a 5,0 favoreceu a produção de colorante vermelho. Em pH 2,59, colorantes amarelos com absorção máxima a 410 nm foram ligeiramente detectados (V/A = 0,67). Na maioria dos ensaios, houve uma maior produção de colorante vermelho (V/A e V/L > 1,0), indicando que no meio fermentado há presença majoritária de colorante vermelho. Se o processo de aminação do colorante laranja é o responsável pela obtenção do colorante vermelho, pode-se dizer que o pH é um dos fatores determinantes para que ocorra a reação de aminação do colorante laranja em detrimento das reações de redução, para formação do colorante amarelo. Em concordância com o primeiro planejamento, o valor de pH que causou a maior produção de colorante vermelho e baixo crescimento celular foi 5,0. No entanto, verificou-se que o meio ácido promoveu um aumento na produção de colorante vermelho até um limite de acidez (pH 4,0), abaixo do qual houve redução drástica na produção. Carels; Shepherd (1977) relataram que a redução do pH inibe a formação de conídios e aumenta a produção de colorantes, sugerindo que o pH do meio pode afetar o transporte de certos constituintes, como glicose e nitrogênio, e também pode atuar na inibição do crescimento.

A maior concentração de GMS incrementou a produção de colorante vermelho, enquanto o consumo de glicose não aumentou significativamente. No entanto, houve queda de produção de colorante vermelho acima da concentração de 25 gL⁻¹ de GMS. Enquanto a concentração de biomassa está ligada à abundância de nutrientes presentes no meio, a produção de colorante é favorecida sob condições de baixa concentração de nutrientes e/ou condições externas de estresse (GMOSER *et al.*, 2017). Hu *et al.* (2015) mostraram que os sais inorgânicos, incluindo o GMS, desempenham um papel importante nas mudanças de pressão osmótica e no crescimento celular da microalga *Schizothrix* sp. Em fungos filamentosos, o GMS também foi associado à pressão osmótica e permeabilidade da membrana, atuando como sistema regulador de estresse, afetando assim o desenvolvimento fúngico (DURAN; CARY; CALVO, 2010). Além disso, em resposta ao estresse osmótico, os fungos

acumulam uma variedade de metabólitos secundários (OVERY *et al.*, 2017). Chadni *et al.* (2017) estudaram condições específicas de estresse osmótico no crescimento e produção de colorantes por *T. verruculosus*. Esses autores descobriram que o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura teve um grande efeito inibidor no crescimento, e concentrações excessivas dificultaram a produção de colorante vermelho.

Como a quantidade de glicose permaneceu alta no meio fermentado ($> 5 \text{ gL}^{-1}$ em algumas condições experimentais), o objetivo do próximo conjunto de experimentos foi avaliar os efeitos do tamanho do inóculo na produção de colorante vermelho cultivado em pH inicial de 5,0; 25 gL^{-1} e 10 gL^{-1} de GMS e glicose, respectivamente.

5.1.3 Efeito do número de discos de micélio inoculados

Os resultados da produção de colorante vermelho variando o número de discos de micélio inoculados estão apresentados na **Tabela 6**. Não houve variação significativa na produção de colorante vermelho e consumo de glicose para 5 ou 10 discos de micélio. No entanto, o crescimento de *T. amestolkiae* e, conseqüentemente, o consumo de glicose foram intensamente afetados pelo número de discos inoculados.

Tabela 6. Avaliação do número de discos de micélio inoculados na produção de colorante vermelho por *T. amestolkiae*. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.

Número de discos de micélio	Colorante vermelho ($\text{UA}_{500\text{nm}}$)	pH final	Consumo de glicose (%) [†]	Biomassa (gL^{-1})	V/A [‡]	V/L [§]
5	$2,73 \pm 0,13$	$5,06 \pm 0,01$	$19,37 \pm 0,29$	$0,93 \pm 0,15$	$1,40 \pm 0,11$	$1,44 \pm 0,10$
10	$2,99 \pm 0,08$	$5,07 \pm 0,00$	$22,35 \pm 0,54$	$1,44 \pm 0,10$	$1,29 \pm 0,06$	$1,29 \pm 0,03$
15	$4,16 \pm 0,02$	$4,96 \pm 0,00$	$51,89 \pm 0,34$	$2,24 \pm 0,09$	$1,34 \pm 0,01$	$1,33 \pm 0,00$

[†]O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

[‡]Relação colorante vermelho/amarelo; [§]Relação colorante vermelho/laranja;

Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Houve um aumento de quase duas vezes na biossíntese do colorante vermelho na condição com 15 discos de micélio. No entanto, a mesma cepa cultivada em diferentes condições apresentou comportamento oposto. Santos-Ebinuma *et al.* (2013) inocularam 5, 10 e 15 discos de micélio de *T. amestolkiae* (anteriormente conhecido como *P. purpurogenum* DPUA 1275) no meio Czapek (CYA) suplementado com extrato de levedura e pH inicial de 6,5. O meio CYA

era composto de fonte complexa de nitrogênio (extrato de levedura) e sacarose como fonte de carbono. Esses autores observaram que um maior número de discos de micélio levou à menor produção de colorante vermelho. O meio CYA é ótimo para o crescimento de fungos, mas quando o inóculo é muito denso pode ocorrer dificuldade no desenvolvimento metabólico do microrganismo. Enquanto no meio CYA a biomassa atingiu a concentração de $17,54 \text{ gL}^{-1}$ às 120 h de cultivo, no presente estudo alcançou-se apenas $2,24 \text{ gL}^{-1}$ de crescimento com GMS-glicose, 15 discos de micélio e 168 h de cultivo. As relações V/A e V/L se mantiveram acima de 1,0 em todas as condições, indicando que havia mais colorante vermelho no meio fermentado. Como o colorante vermelho é produzido a partir da aminação do colorante laranja (CHEN *et al.*, 2017a), mais células aumentaram a produção de colorante laranja que foi convertido em vermelho na presença de GMS. A partir desses resultados, é evidente que o crescimento de *T. amestolkiae* foi intensamente afetado pelo número de discos de micélio inoculados, juntamente com o aumento do consumo de glicose. Deste modo, os próximos experimentos foram realizados com 15 discos de micélio por 50 mL de meio de cultivo.

5.1.4 Efeito da adição de micronutrientes

Com intuito de avaliar o efeito da adição de micronutrientes para melhoria na produção de colorante vermelho, sete suplementos minerais foram testados, nomeadamente, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Cu^+ e Ca^+ . Para esse propósito, um planejamento Plackett-Burman (PBD) de 8 ensaios com dois níveis de concentração foi empregado. Os resultados da produção de colorante vermelho, pH final, biomassa, consumo de glicose e relação entre vermelho/amarelo (V/A) e vermelho/laranja (V/L) estão representados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Planejamento Plackett-Burman empregado na produção de corante vermelho por *T. amestolkiae*. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.

Ensaio	Zn (mgL ⁻¹)	Mn (mgL ⁻¹)	Mg (mgL ⁻¹)	Fe (mgL ⁻¹)	K (mgL ⁻¹)	Cu (mgL ⁻¹)	Ca (mgL ⁻¹)	Colorante vermelho (UA _{500nm})	pH final	Biomassa (g _L ⁻¹)	Consumo de glicose (%) [†]	V/A [‡]	V/L [§]
1	0	0	0	10	0,5	25	0	4,53	4,83	2,83	44,96	1,41	1,33
2	0	0	6	10	0	0	15	6,55	4,78	2,77	57,09	1,52	1,38
3	0	3	0	0	0,5	0	15	2,48	4,83	2,64	26,19	1,31	1,35
4	0	3	6	0	0	25	0	3,91	4,84	2,23	34,91	1,39	1,35
5	10	0	0	0	0	25	15	3,86	4,84	2,46	46,30	1,31	1,32
6	10	0	6	0	0,5	0	0	6,38	4,86	2,27	51,81	1,46	1,39
7	10	3	0	10	0	0	0	5,08	4,88	2,61	58,15	1,46	1,34
8	10	3	6	10	0,5	25	15	4,91	4,86	2,25	45,90	1,41	1,34
9-11(C)	5	1,5	3	5	0,25	12,5	7,5	3,58 ± 0,52	4,83 ± 0,02	2,66 ± 0,15	47,60 ± 1,48	1,35 ± 0,06	1,30 ± 0,03

C - Pontos centrais;

†O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

‡Relação corante vermelho/amarelo; §Relação corante vermelho/laranja.

O PBD é uma ferramenta útil para avaliar rapidamente os principais fatores de um sistema multivariado. Esse tipo de planejamento não determina a quantidade exata de cada variável, mas pode fornecer algumas informações sobre cada fator com relativamente poucos ensaios. Nessa perspectiva, o planejamento saturado do tipo Plackett-Burman permite estimar os efeitos principais dos ensaios com variância mínima, uma vez que na matriz experimental as colunas são todas ortogonais. Ou seja, cada par de colunas possui todas as combinações possíveis entre os níveis e essa simetria permite que os efeitos principais de cada fator sejam determinados individualmente, admitindo-se que os efeitos de interação sejam desprezíveis (PLACKETT; BURMAN, 1946).

De acordo com o desenho experimental, nenhuma das variáveis foi significativa ao nível de confiança de 95 % (**Figura 11.C**). No entanto, os elementos Mg^{2+} , Fe^{2+} e Ca^{+} foram os mais benéficos para o colorante vermelho, já que sua produção aumentou 1,57 vezes utilizando 6, 10 e 15 mgL^{-1} de Mg^{2+} , Fe^{2+} e Ca^{+} , respectivamente. O aumento na produção provavelmente ocorreu porque esses elementos são necessários no metabolismo de microrganismos e podem agir como cofatores em alguma reação vital para produção dos colorantes. Dentre esses três metais, o Mg^{2+} mostrou maior efeito na produção do colorante vermelho. Portanto, um ensaio adicional foi realizado variando a concentração de Mg^{2+} no meio de cultivo. Os resultados estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Avaliação da concentração de $MgSO_4$ na produção de colorante vermelho por *T. amestolkiae*. Os cultivos foram conduzidos por 168 h em agitador rotativo.

Concentração de $MgSO_4$ (mgL^{-1})	Colorante vermelho (UA_{500nm})	pH final	Biomassa (gL^{-1})	Consumo de glicose (%) [†]	VIA [‡]	V/L [§]
6	6,55 ± 0,05	4,8 ± 0,01	2,77 ± 0,04	57,09 ± 0,70	1,52 ± 0,05	1,38 ± 0,05
12	13,44 ± 0,08	4,9 ± 0,02	2,35 ± 0,45	63,59 ± 1,36	1,60 ± 0,08	1,48 ± 0,09
24	6,67 ± 0,39	4,9 ± 0,01	2,70 ± 0,23	57,73 ± 2,85	1,48 ± 0,04	1,40 ± 0,28

[†]O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

[‡]Relação colorante vermelho/amarelo; [§]Relação colorante vermelho/laranja;

Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

A adição de magnésio acima de 12 mgL^{-1} reduziu o consumo de glicose e a produção de colorante vermelho, o que pode ser atribuído parcialmente ao forte efeito regulador negativo da alta concentração de $MgSO_4$ na ação das

enzimas produtoras de colorantes. Lin; Demain (1991) também relataram que altas concentrações de MgSO_4 tiveram um efeito inibidor sobre a síntese de colorantes por *Monascus*. No presente trabalho, a produção de colorante vermelho foi mais intensa e atingiu a produção de $13,44 \text{ UA}_{500\text{nm}}$ na concentração de 12 mgL^{-1} de Mg^{2+} .

Na **Figura 12** está representado o resumo da melhoria da produção de colorante vermelho de acordo com todos os experimentos realizados. Um incremento na produção de colorante vermelho de, aproximadamente, 30 vezes foi alcançado, o que mostra que o estudo com nutrientes é uma ferramenta importante para aumentar a produção de produtos biológicos.

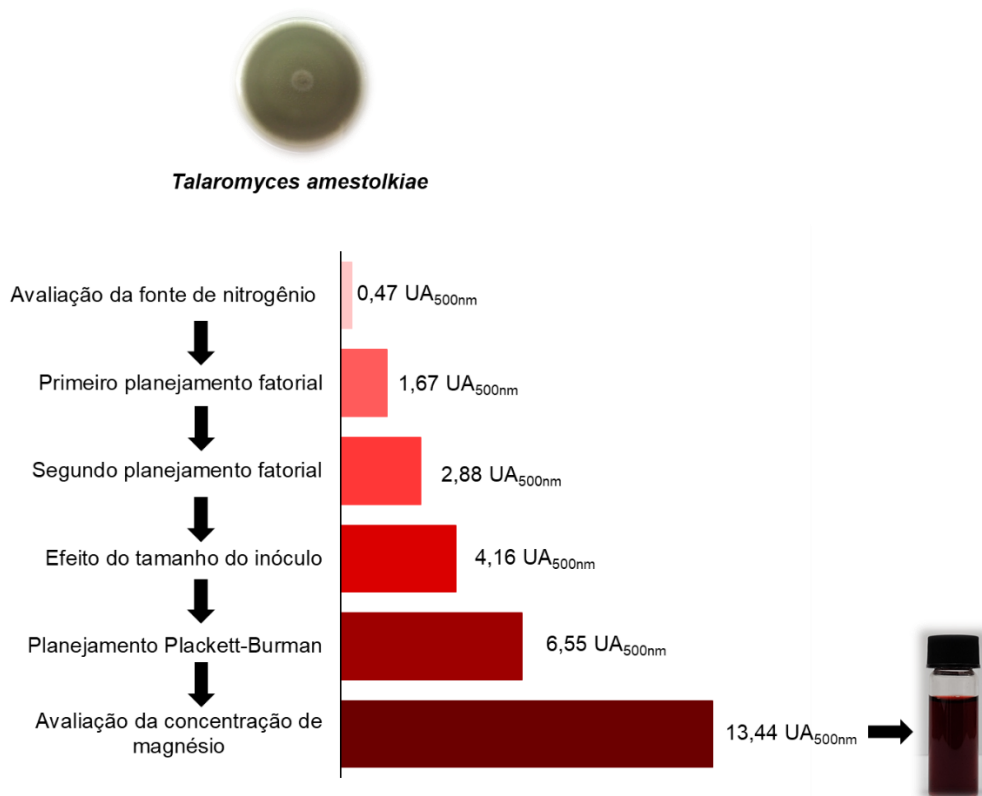


Figura 12. Apresentação esquemática da condição experimental empregada e da respectiva produção de colorantes naturais vermelhos obtidos por cultivo submerso de *T. amestolkiae*.

5.2 Análise colorimétrica

As características de cor do meio fermentado contendo os colorantes vermelhos foram analisadas por análise colorimétrica. Alguns trabalhos

qualificam a cor com base nos estímulos gerados no olho humano pelos vários comprimentos de onda e intensidades da luz visível (MAPARI; MEYER; THRANE, 2006). O sistema da Comissão Internacional de l'Eclairagem (CIE) baseia-se no fato de que a luz refletida de qualquer superfície colorida pode ser visualmente combinada com uma mistura aditiva das três cores primárias: vermelho, verde e azul (ZOLLINGER, 2003). As características de cor das amostras dependem em grande parte da cor e da concentração do colorante dominante na mistura.

Para a maioria dos experimentos em agitador rotativo, os valores de L^* , a^* e b^* foram todos positivos, indicando cores voltadas ao amarelo e vermelho. Os dados brutos da análise colorimétrica estão apresentados na **Tabela S1 do Material Suplementar**. Os valores de luminosidade variaram entre 13 a 87, e os ângulos de matiz variaram de 26 a 87, correspondendo a cores que variam de vermelho escuro a amarelo profundo com base em uma escala de 0 para vermelho, 90 para amarelo, 180 para verde e 270 para o azul. O valor do croma refere-se a quão pura ou "saturada" é uma cor, sendo que altos valores de C^* representam cores vívidas comparadas a baixos valores. Todos os valores de croma variavam em um intervalo de preto a cinza. Com base nos valores de luminosidade, ângulo de matiz e de croma, as melhores condições de cada conjunto de experimento, em termos de produção de colorante vermelho, se classificaram entre os vários tons de laranja e vermelho.

Na **Figura 13** está representada a classificação das cores no espaço de cor do sistema CIELAB. Apenas as melhores condições, em termos de produção de colorante vermelho, de cada conjunto de experimentos estão representadas na **Figura 13**.

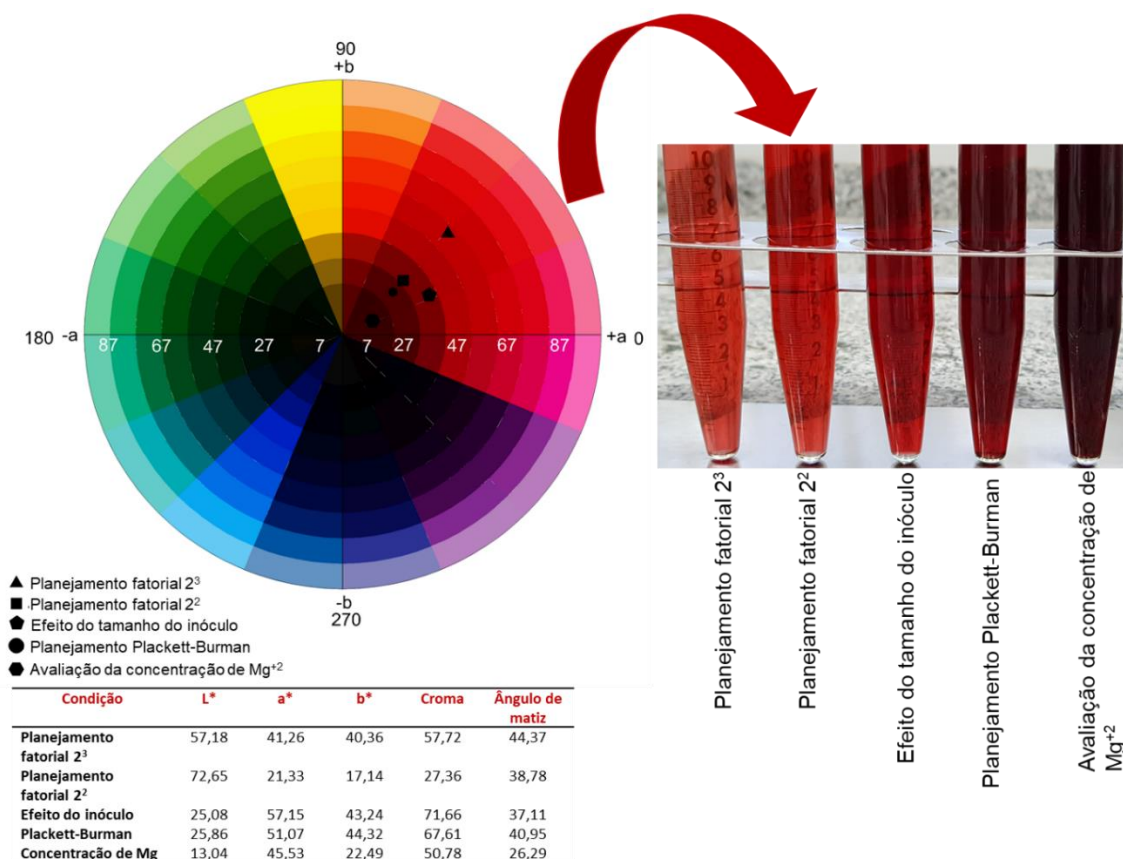


Figura 13. Classificação das cores no espaço CIELAB para as melhores condições testadas, em termos de produção de colorante vermelho por *T. amestolkiae*. Os ângulos de matiz e croma estão associados aos valores L* variando de 13 a 87.

Os ângulos de matiz de, aproximadamente, 70, correspondentes às cores que variam de laranja claro à amarelo alaranjado, foram observados no planejamento fatorial 2³ utilizado para avaliar valores de pH neutro e básico. Os colorantes vermelhos apresentaram várias tonalidades de cor vermelha, e o pH ácido estimulou a produção de tons de vermelho que variam do vermelho opaco ao vermelho terra, o que corresponde às cores vermelhas vívidas. Os ensaios do planejamento central composto 2² apresentaram tons de vermelho que variaram de laranja-vermelho a laranja médio correspondendo a ângulos de matiz de, aproximadamente, 40 a 50. O vermelho-escarlate foi o tom vermelho observado após a adição de 15 discos de micélio no meio de cultivo. A partir dos experimentos com sais, foram alcançados ângulos de matiz mais baixos e altos valores de croma que correspondem às cores vermelho-escuras. Sob a melhor

condição de produção de corante vermelho, após análise da concentração de Mg^{+2} , o ângulo de matiz chegou ao valor de 26,29.

Mapari; Meyer; Thrane (2006) compararam os ângulos de matiz dos colorantes derivados de *Penicillium*, *Epicoccum* e *Monascus* com colorantes naturais solúveis em água derivados de fontes naturais mais usadas (carmim ácido-estável, ácido carmínico, raiz de beterraba, entre outros). Os ângulos de matiz dos extratos fúngicos variaram de 40 a 110, dependendo do meio de cultivo analisado, indicando a distribuição de cor na região vermelho-laranja-amarelo do espaço de cor CIELAB. O ângulo de matiz do carmim ácido-estável foi de 358,4, da raiz de beterraba foi de 352,2, ambos indicando cor azul-vermelho claro. O ângulo de matiz do ácido carmínico foi de 72,5 indicando cor laranja claro. Neste presente estudo, os colorantes produzidos por *T. amestolkiae* apresentaram ângulos de matiz mais baixos, alcançando a região das cores vermelhas mais escuras.

5.3 Análise de fluorescência

Nos últimos anos, os estudos de fluorescência tridimensional (3D) tornaram-se uma ferramenta útil para monitorar as mudanças estruturais dos fluoróforos (SÁ *et al.*, 2017). Estudos de fluorescência 3D forneceram evidências adicionais quanto às mudanças estruturais dos colorantes, induzidas pela complexação com os sais adicionados no meio de cultivo. Essas informações se tornam úteis para o estudo de mudança da conformação característica de cada fluoróforo e podem ser relacionadas com a cor do meio fermentado representada pelo colorante majoritário. Na **Figura 14** estão representados os espectros de fluorescência 3D do meio fermentado das condições na ausência e presença dos sais: $MgSO_4$, $FeSO_4$, KCl , $CuSO_4$ e $CaCl_2$. Estas condições representam os cultivos do estudo do efeito do número de discos de micélio inoculados e do planejamento Plackett-Burman, respectivamente.

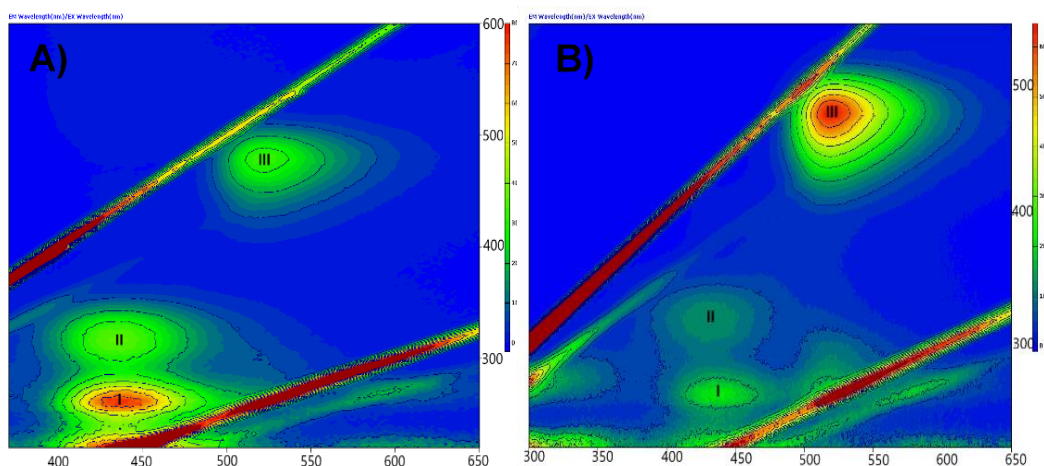


Figura 14. Espectros 3D de excitação e emissão de fluorescência do meio fermentado na **(A)** ausência de MgSO_4 , FeSO_4 , KCl , CuSO_4 , CaCl_2 e **(B)** presença dos sais. Três regiões distintas de fluorescência foram identificadas **(A)** I (λ_{ex} 258 nm, λ_{em} 434 nm, Intensidade de fluorescência = 313920 UF), II (λ_{ex} 316 nm, λ_{em} 432 nm, I = 150000 UF) and III (λ_{ex} 476 nm, λ_{em} 520 nm, I = 133400 UF); **(B)** I (λ_{ex} 258 nm, λ_{em} 434 nm, I = 94800 UF), II (λ_{ex} 314 nm, λ_{em} 426 nm, I = 54600 UF) e III (λ_{ex} 480 nm, λ_{em} 520 nm, I = 258360 UF).

Os comprimentos de onda de absorção máxima ($\approx$ excitação) e emissão são os termos típicos usados para se referir a um determinado fluoróforo, mas todo o espectro deve ser considerado. Os valores de comprimento de onda de excitação podem ser uma faixa muito estreita ou ampla, ou pode estar além do nível de corte (ISMAEL; SCHWANDER; HENDRIX, 2013).

Os espectros de fluorescência do meio fermentado obtidos antes e após a complexação com sais apresentaram três áreas distintas de fluorescência. As três áreas distintas apresentaram uma clara diferença entre os espectros obtidos antes e após a adição de sais no meio de cultivo (**Figura 14.A e 14.B**, respectivamente). A região I foi o pico mais intenso em λ_{ex} 258 nm e λ_{em} 434 nm antes da adição de sais (I = 313920) e permaneceu idêntica nos comprimentos de onda máximos após a complexação com eles, mas perdeu intensidade (I = 94800) (**Figura 14**, regiões I). A segunda região com menor intensidade, λ_{ex} 316 nm, λ_{em} 432 nm e I = 150000 (**Figura 14** - regiões II), não só perdeu intensidade após a adição de sais, mas sofreu mudança no pico máximo de comprimento de onda. Uma ligeira mudança nos picos também foi observada para a terceira região, mas com um aumento de intensidade de quase 2 vezes. Com base na

literatura, as diferenças na concentração de um colorante resultam em diferenças na intensidade da fluorescência, mas sem desvios em λ_{ex} ou λ_{em} máximos. No entanto, concentrações mais altas de alguns colorantes resultaram em mudanças no λ_{em} para comprimentos de onda maiores (SIMONOT; THOURY; DELANEY, 2011).

Ademais, a intensidade de fluorescência em solução bem como os máximos de excitação e emissão, podem ser influenciados pelo pH e por cátions complexados à molécula do fluoróforo (LAKOWICZ; LAKOWICZ, 1983). Os colorantes derivados de policetídeos da classe das azafilonas são geralmente compostos por um núcleo bicíclico pirano-quinona altamente oxigenado, denominado 2-benzopirano, e um centro de carbono quaternário (GAO; YANG; QIN, 2012). Alguns estudos também reportaram azafilonas de *Monascus* sp. apresentando propriedades fluorescentes (GAO; YANG; QIN, 2012; HSU *et al.*, 2011; LORET; SANDRINE, 2010). Ademais, similaridades foram encontradas entre o colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae* e o colorante laranja relatado por Huang *et al.* (2014), que emitem fluorescência amarela (λ_{ex} 480 nm, λ_{em} 520 nm; **Figura 14.B**, fluoróforo III). Os fluoróforos I e II encontrados no meio fermentado não puderam ser atribuídos a um colorante específico, pois seus padrões de fluorescência possuem múltiplas identificações possíveis. Os resultados obtidos da análise colorimétrica e de fluorescência mostram que os colorantes produzidos por *T. amestolkiae* apresentam uma ampla gama de aplicação. Por exemplo, as propriedades de fluorescência são interessantes no desenvolvimento de *kits* de diagnóstico. Enquanto a amplitude de matiz e croma desses colorantes seguem as tendências atuais das indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (VINHA *et al.*, 2018).

Em seguida, alguns aditivos foram adicionados ao meio GMS-glicose para estudar o efeito da suplementação desse meio na produção do colorante vermelho.

5.4 Suplementação do meio GMS-glicose

Como relatado no item 5.1.1, há evidências que corroboram com nossos resultados mostrando que meios de cultivo definidos, ou não-complexos, com aminoácidos como fonte de nitrogênio promovem a produção e excreção de colorantes extracelulares de *Monascus* (HAJJAJ *et al.*, 1997; LIN; DEMAIN,

1994). Os colorantes reagem com aminas, como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, para formar γ -piridonas vinílicas vermelhas ou roxas devido à troca de oxigênio do pirano por nitrogênio (STADLER *et al.*, 1995; WEI; YAO, 2005). Além disso, a liberação desses colorantes primários hidrofóbicos depende das fontes amino-específicas para estimular a produção de colorante vermelho (LIN *et al.*, 1992).

A fim de explorar industrialmente os colorantes de *T. amestolkiae*, há a necessidade de saber quais precursores estão envolvidos na biossíntese desses metabólitos secundários e conseguir alcançar o rendimento máximo de colorante vermelho, mantendo as condições ótimas de crescimento alcançadas para o meio GMS-glicose. Dessa forma, foram investigadas uma série de fontes de aminas e vitaminas como suplementação para o meio GMS-glicose (**Tabela 9**). Portanto, três fontes complexas de nitrogênio (extrato de levedura, extrato de carne e peptona de carne), seis aminoácidos individuais (ácido glutâmico, treonina, tirosina, glicina, cisteína e triptofano), e duas vitaminas puras (biotina e tiamina) foram adicionados ao meio GMS-glicose (controle) como aditivos para o crescimento de *T. amestolkiae* e síntese de colorantes.

Tabela 9. Influência dos aditivos na suplementação do meio GMS-glicose na produção do corante vermelho por *T. amestolkiae* em 30 °C e 150 rpm em agitador rotativo por 168 h.

Suplementação (g L ⁻¹)	Colorante vermelho (UA _{500nm})	pH final	Biomassa (g L ⁻¹)	Consumo de glicose (%)**	V/A†	V/L‡
Controle†	14,00 ± 0,02	4,9 ± 0,01	2,35 ± 0,36	64,00 ± 0,05	1,60 ± 0,03	1,48 ± 0,07
Fontes complexas de nitrogênio						
Extrato de levedura (0,5)	1,38 ± 0,39	6,3 ± 0,01	3,90 ± 0,23	97,71 ± 2,85	0,63 ± 0,04	0,92 ± 0,28
Extrato de levedura (2,0)	0,44 ± 0,10	7,9 ± 0,01	4,76 ± 0,09	94,89 ± 1,08	0,35 ± 0,76	0,73 ± 0,63
Extrato de carne (0,5)	2,16 ± 0,05	4,8 ± 0,01	3,77 ± 0,04	100,0 ± 0,70	0,90 ± 0,05	1,10 ± 0,05
Extrato de carne (1,0)	3,11 ± 0,08	5,6 ± 0,02	4,17 ± 0,45	99,27 ± 1,36	0,83 ± 0,08	1,15 ± 0,09
Peptona de carne (0,5)	7,01 ± 0,23	7,4 ± 0,10	5,39 ± 0,14	98,78 ± 0,34	1,17 ± 0,34	1,21 ± 0,69
Aminoácidos						
Ácido glutâmico (0,7)	6,41 ± 0,05	5,0 ± 0,02	2,42 ± 0,78	77,03 ± 0,12	1,47 ± 0,23	1,43 ± 0,07
Treonina (0,7)	5,19 ± 0,08	4,9 ± 0,08	2,09 ± 0,45	81,26 ± 0,09	1,23 ± 0,06	1,25 ± 0,08
Tirosina (0,7)	4,04 ± 0,07	4,9 ± 0,03	2,73 ± 0,09	75,83 ± 0,54	1,23 ± 0,08	1,28 ± 0,04
Glicina (0,7)	3,45 ± 0,34	4,8 ± 0,35	2,34 ± 0,21	77,94 ± 0,32	1,26 ± 0,67	1,26 ± 0,86
Cisteína (0,7)	2,77 ± 0,25	4,8 ± 0,22	2,28 ± 0,27	58,25 ± 0,05	1,41 ± 0,23	1,30 ± 0,79
Triptofano (0,7)	2,71 ± 0,05	4,9 ± 0,03	2,18 ± 0,05	91,00 ± 0,05	1,32 ± 0,07	1,31 ± 0,08
Vitaminas						
Biotina (0,1)	6,66 ± 0,67	5,0 ± 0,01	2,42 ± 0,07	58,34 ± 0,08	0,99 ± 0,84	1,09 ± 0,20
Tiamina (0,1)	18,10 ± 0,83	5,0 ± 0,03	2,55 ± 0,34	99,16 ± 0,41	1,30 ± 0,06	1,42 ± 0,04

†Controle (meio GMS-glicose) corresponde ao meio sem suplementação e teve a seguinte composição (g L⁻¹): GMS (25), glicose (10), MgSO₄ (0,012), FeSO₄ (0,010), CaCl₂ (0,015). Todos os meios tiveram pH ajustado para 5,0 e foram autoclavados a 121 °C por 15 min;

‡Relação corante vermelho/amarelo; §Relação corante vermelho/laranja;

*O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

A produção de corante vermelho na presença dos aditivos foi menor que a produção do controle, com exceção da suplementação com tiamina (**Tabela 9**). Por outro lado, a adição de fonte complexa de nitrogênio (extrato de carne, extrato de levedura e peptona de carne) ao meio GMS-glicose aumentou a formação de biomassa, como esperado. Nessas condições, observou-se também um aumento na produção de colorantes amarelo e laranja (V/A e V/L < 1,0). Considerando que a produção de corante por *M. ruber* está associada ao crescimento (KONGRUANG, 2011; SHI *et al.*, 2015), parece que o acúmulo de biomassa e a produção de corante vermelho não estão diretamente associados para a espécie *P. purpureogenum* GH2 (MÉNDEZ *et al.*, 2011). Nesse caso, é possível que a produção de corante vermelho ocorra em detrimento da produção de biomassa, como em *T. atroroseus* (MAPARI *et al.*, 2008; TOLBORG *et al.*, 2020).

A combinação de extrato de carne e peptona resultou em altas taxas de crescimento e de consumo de glicose, e rendimentos intermediários do corante. O pH aumentou de 5,0 para 7,4 durante o processo de fermentação. Parece que a melhor condição de pH para alcançar altos rendimentos de

colorantes por *T. amestolkiae* é 5,0. Segundo a literatura, o pH ambiental tem sido descrito como fator de estresse, que estimula a produção de colorantes em fungos filamentosos (CHRISTIANA, 2016; TUDOR; ROBINSON; COOPER, 2013). A combinação de pH com a fonte de nitrogênio parece ser um fator-chave que afeta a esporulação, coloração e formação de biomassa em fungos (PATAKOVA; BRANSKA; PATROVSKY, 2017). Vários estudos têm demonstrado que as condições e a composição do meio de cultivo, especialmente o tipo e concentração da fonte de nitrogênio, desempenham um papel importante no ciclo reprodutivo fúngico e no tipo e quantidade de colorante produzido (CHEN; WU, 2016; SHI *et al.*, 2015; VENDRUSCOLO *et al.*, 2016a). O pH do meio pode mudar dependendo da fonte de nitrogênio, o que pode contribuir na composição dos colorantes, como observado em *Monascus*, por exemplo (KANG *et al.*, 2014).

Os fungos filamentosos exibem várias morfologias distintas durante o cultivo submerso, dependendo do organismo e das condições utilizadas. Em muitas espécies, a reprodução assexuada (conidiação) é completamente suprimida, embora um ciclo assexuado abreviado, a conidiação microcíclica que ocorre muitas vezes em resposta ao estresse ambiental, tenha sido relatada em cultivos de uma série de fungos (ADAMS; WIESER; YU, 1998). Em condições ambientais favoráveis, cada conídio pode produzir um micélio novo (KRASNIEWSKI *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, o extrato de levedura aumentou o pH (acima de 5,0) estimulando a conidiação e aumentando a produção de biomassa. Devido ao desenvolvimento dos conídios (sinônimo de esporos) em micélio vegetativo, a produção de colorante permaneceu em um nível relativamente baixo. Em adição, em condição básica de pH (pH final de 7,9) e maior concentração de extrato de levedura, aumentou-se a formação de colorantes amarelo e laranja (V/A e $V/L < 1,0$). Como a produção de muitos metabólitos secundários é favorecida em velocidade de crescimento baixa, a suplementação com fontes complexas de nitrogênio não favoreceu a produção de colorante vermelho. Corroborando com os nossos resultados, Méndez *et al.* (2011) relataram que o pH neutro está associado às condições ideais para o crescimento de *P. purpureogenum*, mas não com o estresse metabólico que está claramente associado à produção de colorantes.

Para avaliar o efeito da suplementação do meio com aminoácidos, seis aminoácidos diferentes foram adicionados ao meio GMS-glicose. Uma comparação das quantidades relativas dos colorantes produzidos mostrou que a biossíntese do colorante vermelho foi suprimida pela suplementação com aminoácidos. De acordo com a literatura, o L-glutamato é o principal precursor do 4-aminobutirato (GABA). A produção de GABA é considerada como um desvio do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) que pode levar à produção de semialdeído succínico (desvio do GABA) e está associada ao metabolismo de esporulação (KUMAR; PUNEKAR, 1997). A reação de GABA com o precursor rubropunctatina contendo o oxigênio no anel é mencionada por Venkatachalam *et al.* (2018) para o metabolismo do fungo *T. albobiverticillius*. Foi relatado que um declínio no ciclo TCA poderia levar a um acúmulo de acetil-CoA que é essencial para a biossíntese de policetídeos. De acordo com as estruturas moleculares dos colorantes fúngicos, tais colorantes são derivados de policetídeos e ácidos graxos, que compartilham os mesmos precursores e cofatores como acetil-CoA, malonil-CoA, NADH e NAD(P)H (CHEN *et al.*, 2017b). O acetil-CoA é um elemento fundamental no metabolismo central de carbono, metabolismo de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos, metabolismo energético e acetilação de proteínas (KRIVORUCHKO *et al.*, 2015). Os colorantes laranjas são sintetizados pela esterificação dos compostos β -cetoácidos e policetídeos, enquanto os colorantes amarelos são formados devido à redução do colorante laranja por NAD(P)H. Chen *et al.* (2017b) relataram o transcriptoma das cepas de *Monascus* e mostraram que os genes expressos estavam envolvidos principalmente na degradação da valina, leucina e isoleucina; metabolismo de glicina, serina e treonina; e na via biossintética de colorantes. Portanto, esse fluxo metabólico implícito para acetil-CoA durante a síntese do colorante e o aminoácido que contribui com o grupo NH_3 para aminação é importante para a síntese de colorante vermelho.

Ademais, as vitaminas biotina e tiamina também foram investigadas. O maior valor de colorante produzido foi de 18,10 $\text{UA}_{500\text{nm}}$ para suplementação com tiamina, que foi aproximadamente 1,3 vezes maior que a produção do controle. A tiamina também contribuiu para o consumo superior de glicose quando comparada com o controle. O pH final não mudou (pH 5,0) durante o cultivo. Parece que a repressão da conidiação levou aos melhores rendimentos de

colorantes, juntamente com o pH ácido resultando nas interações do colorante laranja com grupos amina, consequentemente, dando origem aos colorantes vermelhos. O controle do pH afeta o crescimento de fungos filamentosos e também a biossíntese de centenas de metabólitos secundários (GARCÍA-ESTRADA *et al.*, 2018). Geralmente, um pH final entre 6-8 não é benéfico para o acúmulo de colorantes vermelhos. Como já mencionado, um pH final relativamente baixo e a existência de fontes de grupos amina reativos favorecem a formação do colorante vermelho. Isso pode ser considerado uma informação importante sobre a manutenção do pH no cultivo em biorreator. No entanto, o aumento na produção de colorante vermelho de 1,3 vezes não foi significativo em termos de produtividade para justificar a adição de tiamina ao controle, uma vez que a suplementação com tiamina aumentaria o custo do meio de cultivo.

5.4.1 Características dos colorantes derivados da suplementação do meio GMS-glicose

A variedade de cores derivadas dos experimentos de suplementação foi determinada pelas quantidades de amarelo, laranja e vermelho produzidos após 168 h de cultivo submerso de *T. amestolkiae*. A tonalidade do colorante vermelho produzido variou de acordo com o meio de cultivo utilizado. Assim, os valores de L^* , a^* e b^* foram todos positivos, indicando tons amarelo e vermelho (**Figura 15**).

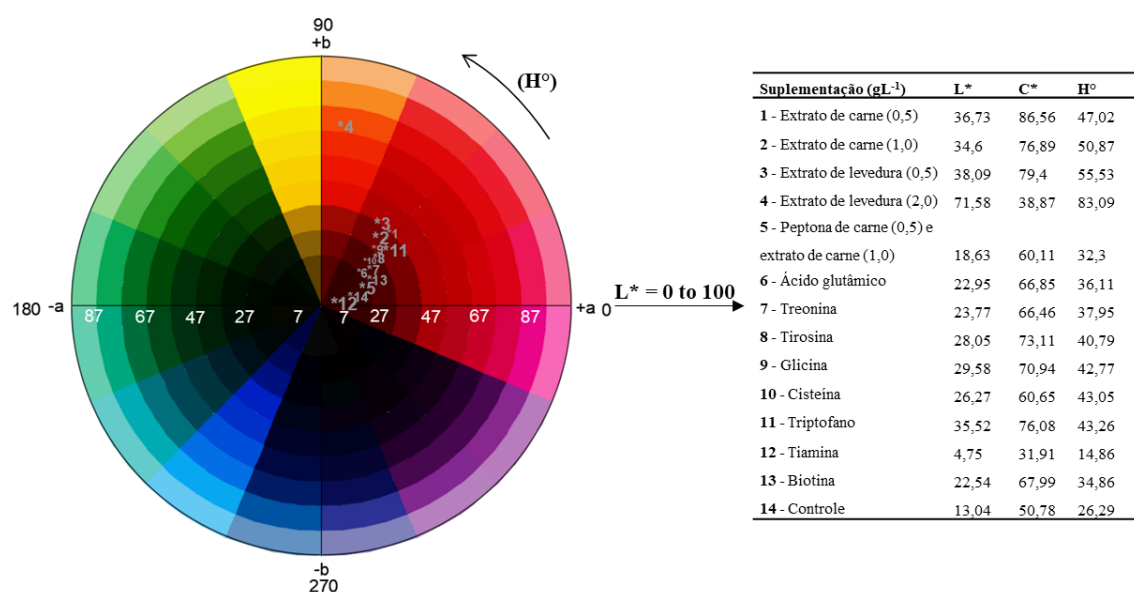


Figura 15. Mudança qualitativa de cor no espaço de cor CIELAB para os colorantes produzidos por *T. amestolkiae* em todas as condições de suplementação estudadas. Croma (C^*) = $\sqrt{a^2/b^2}$. Ângulo de matiz (H°) = $\tan^{-1}(b^*/a^*)$. L^* indica luminosidade para 0 (preto) a 100 (branco). O valor positivo a^* indica a cor vermelha, enquanto o valor negativo a^* representa a cor verde. Da mesma forma, os valores b^* positivos e negativos indicam as cores amarela e azul, respectivamente. Os valores de croma denotam a saturação ou pureza da cor. Os valores do ângulo de matiz representam o grau de vermelhidão, amarelo, verde e azul; o máximo é 0, 90, 180 e 270, respectivamente.

Como apresentado, os ângulos de matiz (H°) derivados das condições utilizando fonte complexa de nitrogênio (extrato de carne, peptona de carne e extrato de levedura) variaram de 32,3 a 83,09, significando presença de colorantes laranja escuro à laranja claro. Em maior concentração de extrato de levedura, o principal produto foi o colorante laranja favorecido em condições básicas de pH. Em relação ao croma, que denota quão pura ou saturada é uma cor, já que o croma alto é mais vívido do que o croma baixo, a suplementação com $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de extrato de levedura levou à formação de cores vermelhas mais brilhantes dentre as fontes complexas de nitrogênio. Os ângulos de matiz (36-43) indicaram que vários colorantes na faixa de vermelho alaranjado à laranja médio foram produzidos pela adição de aminoácidos. Ainda, os valores de croma variaram em uma faixa de 60-76, indicando cores opacas até as mais brilhantes, de acordo com o aminoácido avaliado.

Jung *et al.* (2003) estudaram 20 aminoácidos como precursores na produção de colorantes por *Monascus* e relataram que a produção dos colorantes amarelo e laranja era idêntica independentemente da adição de aminoácidos, enquanto os compostos vermelhos variavam com base no aminoácido adicionado. Em nosso estudo, os colorantes vermelhos produzidos na presença de tiamina e no controle variaram os ângulos de matiz de 0 a 30, correspondendo às cores vermelho profundo ou vermelho escuro. O colorante vermelho derivado da tiamina teve menor ângulo de matiz do que o controle, correspondendo à cor vermelha profunda. Isso indica claramente um equilíbrio diferente entre os compostos coloridos produzidos por diferenças na suplementação do meio de cultivo. Compostos laranja claros estão relacionados

a uma maior concentração de extrato de levedura, a cor laranja média está relacionada com a presença de aminoácidos no meio, exceto para o ácido glutâmico que promoveu a produção de colorantes vermelho-alaranjados. Outros colorantes vermelho-alaranjados apareceram na suplementação com peptona de carne e biotina, enquanto a cor vermelha profunda apareceu na suplementação com tiamina. No entanto, considerando que um dos obstáculos na produção em larga escala dos colorantes é o custo do processo, a adição de tiamina ao controle apresenta desvantagens. Devido ao incremento de produção do colorante vermelho usando tiamina ser baixo, o GMS ainda é a melhor opção disponível para aplicação industrial. Dessa forma, os próximos experimentos foram feitos sem suplementação ao meio de GMS-glicose.

5.5 Estudo do crescimento do microrganismo em diferentes fontes nutricionais

Sabendo-se que a morfologia celular de microrganismos filamentosos pode afetar significativamente o cultivo em biorreator, deve-se estabelecer a condição fisiológica e o estágio correto de desenvolvimento para alcançar a formação máxima do produto (KIM *et al.*, 2002; LV *et al.*, 2017; MUSONI *et al.*, 2015). Vários fatores como pH, nível de oxigênio, temperatura, composição do meio de cultivo, nutrientes e íons foram associados à mudança morfológica de crescimento em filamentos para a morfologia de crescimento em *pellets* e vice-versa (CHEN *et al.*, 2017a; KUMAR; DUBEY, 2017). Especialmente mudanças no tipo e quantidade de nitrogênio presente no meio são responsáveis por alterações fisiológicas e morfológicas em fungos filamentosos, além da ativação da síntese de uma ampla gama de metabólitos secundários (TUDZYNSKI, 2014).

Como mencionado na seção 5.4, algumas condições podem favorecer o crescimento fúngico, enquanto outras desviam a rota metabólica para a produção de colorantes. A combinação de fonte complexa de nitrogênio e pH neutro estimulou a produção de biomassa, enquanto para a formação de colorantes, a combinação do meio com GMS como única fonte de nitrogênio e pH 5,0 foi mais adequada. Para avaliar os efeitos tanto do tipo de nitrogênio quanto do pH inicial na produção de colorantes, o fungo *T. amestolkiae* foi investigado em cultivos utilizando-se o meio GMS-glicose (pH inicial 5,0) e meio

complexo (pH inicial 7,0). Esses experimentos foram essenciais para a definição da composição do meio do inóculo nos cultivos em biorreator. Como reportado na seção 5.1.1, o meio de cultivo relatado por Zaccarim *et al.* (2018) é ótimo para o crescimento de *T. amestolkiae*, portanto esse meio foi utilizado para este estudo. No entanto, a carga de discos de micélio foi acrescida de 10 para 30 discos por 100 mL, como usado para o meio GMS-glicose. Os resultados são retratados na **Figura 16**.

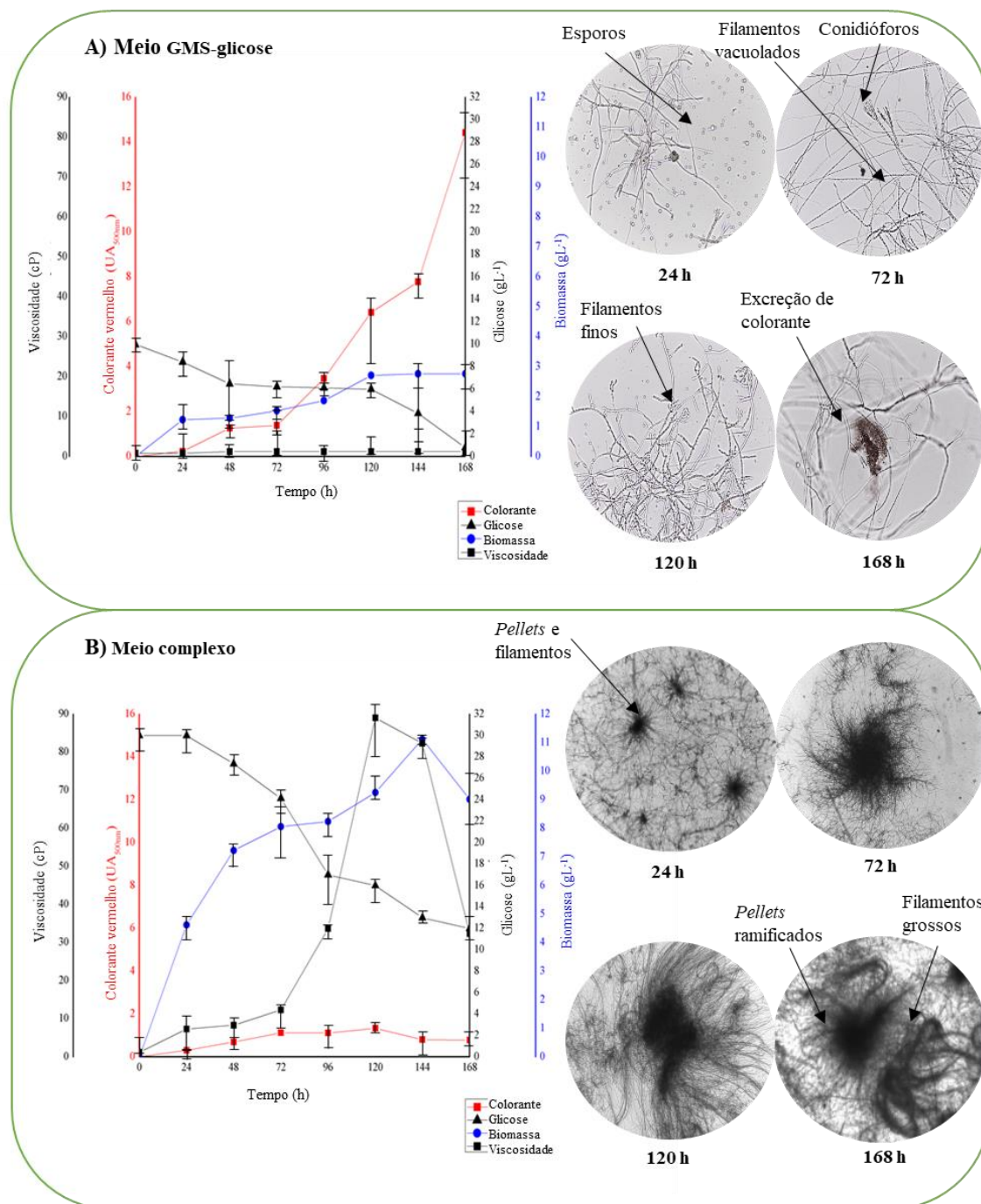


Figura 16. (A) Crescimento do fungo *T. amestolkiae* em meio GMS-glicose e **(B)** meio complexo, e suas respectivas estruturas macromorfológicas. Observação por microscopia de campo claro em ampliação de 100X. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e 150 rpm em agitador rotativo. Os ensaios foram realizados em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Além da fonte de nitrogênio e do pH inicial, a concentração inicial de glicose (10 gL^{-1} e 30 gL^{-1}) também foi diferente nos cultivos de GSM-glicose e meio complexo, respectivamente. A concentração inicial de glicose de 10 gL^{-1} (cultura MSG-glicose) foi quase completamente esgotada ao final do cultivo (**Figura 16**). No entanto, 56 % da glicose inicial de 30 gL^{-1} permaneceu no meio complexo. Para a cultura GSM-glicose, baixo crescimento ($2,03 \text{ gL}^{-1}$) juntamente com altos rendimentos de colorantes ($14,43 \text{ UA}_{500\text{nm}}$) foram alcançados, enquanto para o meio complexo foi obtida alta concentração de biomassa ($11,20 \text{ gL}^{-1}$) como esperado, mas sob baixa produção de colorante ($0,79 \text{ UA}_{500\text{nm}}$). A limitação de carbono do meio GSM-glicose provavelmente também favoreceu o baixo crescimento do microrganismo.

Um dos principais desafios do uso de fungos filamentosos como o *Talaromyces* para produção de metabólitos é o controle do crescimento fúngico, morfologia e transferência de massa (CORRÊIA GOMES; TAKAHASHI, 2016). Para a cultura GSM-glicose, a viscosidade aparente foi semelhante à viscosidade da água ($\eta_a = 1,23 \text{ cP}$) durante o processo de fermentação (**Figura 16.A**). Em relação ao desenvolvimento do fungo, houve pouca formação de micélio na morfologia de hifas longas, dispersas e super vacuoladas ao longo do cultivo. Também pode-se observar a excreção de colorantes no meio de cultivo. Como mencionado, o meio contendo GSM como única fonte de nitrogênio restringe o desenvolvimento de conídios no crescimento vegetativo do micélio e pode ser responsável por desencadear uma reação de estresse (associada à síntese de colorantes) devido à baixa diversidade de nutrientes e pressão osmótica causada pela sua alta concentração (25 gL^{-1}).

Com relação ao meio complexo, a viscosidade aparente permaneceu, aproximadamente, constante desde o início da fermentação mantendo valores abaixo de $12,31 \text{ cP}$ até 72 h . Em seguida, esse parâmetro aumentou drasticamente até 120 h (chegando a $89,00 \text{ cP}$) e reduziu ligeiramente no final da fermentação, quando a biomassa também diminuiu (**Figura 16.B**). Em alta concentração celular, a viscosidade do meio aumenta e limita o fornecimento de oxigênio para as células (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; VENDRUSCOLO *et al.*, 2012). Geralmente, quanto mais viscoso for o caldo de cultivo, mais difícil se torna a transferência de massa entre a fase gasosa e a fase líquida. Uma transferência de massa adequada envolve a distribuição homogênea dos

componentes do meio, pH, temperatura, oxigênio e suspensão celular (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Portanto, a baixa produção metabólica no meio complexo pode ser atribuída ao aumento da viscosidade do caldo e, portanto, à mistura e transferência de massa insuficientes.

Como retratado na **Figura 16.B**, a formação de micélios agregados (*pellets*) predominou no início do cultivo com o meio complexo. À medida que o microrganismo cresceu rapidamente, os filamentos incidentes dos *pellets* aumentaram em quantidade (*pellets* altamente ramificados) e as hifas densas e longas dominaram o meio aumentando a viscosidade aparente. Foi relatado que caldos de cultivo viscosos podem ser desencadeados pela agregação entre as hifas longas de micélios altamente ramificados e/ou ramificação e agregação de *pellets* (OLSVIK; KRISTIANSEN, 1994).

Muitos pesquisadores têm afirmado que diferentes morfologias do micélio fúngico em diferentes níveis iniciais de pH atuam como um fator crucial na formação de biomassa e produção e excreção de metabólitos (KIM *et al.*, 2002; MÉNDEZ *et al.*, 2011). Diante do exposto, a formação de *pellets* pode ser explicada pela influência do pH no crescimento microbiano. A espécie *T. amestolkiae* parece ser sensível às mudanças de pH, pois sua morfologia variou de fragmentos de micélio curtos e presença de esporos em pH 5,0 (meio GSM-glicose) a *pellets* altamente ramificados em pH 7,0 (meio complexo). É possível que a concentração de íons de hidrogênio intracelulares juntamente com o potencial elétrico da membrana determinem a força da bomba de prótons que direciona as reações da membrana levando à formação dos *pellets* (ZHOU *et al.*, 2009). A formação de *pellets* fúngicos foi atribuída à combinação de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e interações específicas de componentes da parede dos esporos (ZHANG; ZHANG, 2016). Portanto, a morfologia microbiana pode ser afetada por essa mudança no nível de membrana que, por sua vez, pode influenciar na produção e excreção do colorante.

Apesar da baixa produção de colorantes em meio complexo em comparação com o meio GSM-glicose, foi relatado que a formação de *pellets* altamente ramificados favorece a produção de alguns metabólitos (PAPAGIANNI, 2004; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018). Para fins práticos e na ausência de hifas densas e longas, a morfologia peletizada é mais conveniente em cultivos em biorreator, pois nessa condição o caldo de cultivo

apresenta baixa viscosidade e se comporta como um fluido newtoniano, facilitando a mistura e homogeneização do caldo (KIM *et al.*, 2002). Além disso, a formação do colorante vermelho pode ser atribuída principalmente ao estresse metabólico causado pela baixa diversidade de fontes de nitrogênio do meio GMS-glicose. No entanto, na cultura GMS-glicose, a glicose foi completamente esgotada e o crescimento do fungo permaneceu constante, alcançando a máxima formação do metabólito. O desafio é equilibrar o crescimento celular a taxas intermediárias, de forma que problemas de transferência de massa possam ser evitados, e alcançar a máxima produção metabólica. Diante do exposto, o controle do pH através do tempo pode tornar possível o equilíbrio do crescimento e a máxima produção de colorantes. Dessa forma, a morfologia celular deve ser controlada nos estágios iniciais de crescimento para manter altos níveis de oxigênio dissolvido no biorreator. Assim, os cultivos em biorreator foram realizados variando a composição do meio do inóculo (meio GMS-glicose e meio complexo) e a taxa de aeração (2,0 a 8,0 Lmin⁻¹) a fim de investigar a melhor condição para condução do processo. Os dois tipos de inóculos foram transferidos para o biorreator contendo o meio de cultivo GMS-glicose.

5.6 Cultivos em biorreator tanque agitado

5.6.1 Avaliação da composição do meio do inóculo

Sabe-se que para várias espécies de fungos, a fragmentação do micélio é aumentada pelo aumento da tensão de cisalhamento que, por sua vez, é aumentada pelo aumento da frequência de agitação do impleidor. Como consequência, a morfologia do microrganismo pode mudar. Por outro lado, a taxa de aeração determina a oxigenação do processo de fermentação e contribui na mistura e homogeneização do caldo de cultivo, além de promover a solubilidade do oxigênio, especialmente quando são necessárias baixas frequências de agitação, como no caso dos fungos filamentosos (ZHOU; TIAN; ZHONG, 2019). Para investigar a relação entre morfologia fúngica, viscosidade aparente do caldo de cultivo e produtividade do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*, foram preparados dois inóculos de diferentes composições de meio (100 mL de meio líquido em frasco do tipo Erlenmeyer de 500 mL), que foram transferidos para um biorreator de 4 L de volume útil contendo o meio de cultivo GMS-glicose. Adicionalmente, variou-se a taxa de aeração. As seguintes

condições de cultivos foram mantidas constantes no biorreator: temperatura a 30 °C, frequência de agitação a 100 rpm e pH ajustado para 5,0 pela adição de NaOH ou H₂SO₄ (1,0 M) ao longo do cultivo. O principal objetivo foi comparar a composição do meio do inóculo sobre a capacidade de produção de colorantes em um mesmo meio de cultivo, variando a taxa de aeração. O meio de cultivo contido na dorna do biorreator foi o mesmo (GMS-glicose) em todos os cultivos. A composição do meio dos inóculos empregados foram o meio GMS-glicose e o meio complexo, ambos cultivados em agitador rotativo a 30 °C, 150 rpm e 24 ou 48 h, respectivamente. A produção de colorante vermelho, consumo de glicose, biomassa e viscosidade aparente final de cada cultivo em biorreator estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Cultivos em biorreator tanque agitado para produção de colorante vermelho por *T. amestolkiae* a 30 °C e 100 rpm. Valores obtidos ao final do cultivo (120 h).

Aeração	Composição do meio do inóculo	Colorante vermelho UA _{500nm}	Consumo de glicose (%)**	Biomassa (gL ⁻¹)	Viscosidade aparente (cP) [§]
2,0 Lmin ⁻¹	GMS-glicose	1,24 ± 0,45	23,00 ± 0,05	0,23 ± 0,04	2,87 ± 0,98
8,0 Lmin ⁻¹	GMS-glicose	4,37 ± 0,32	27,46 ± 0,02	1,02 ± 0,09	3,75 ± 0,31
8,0 Lmin ⁻¹	Meio complexo	9,33 ± 0,09	72,38 ± 0,02	4,53 ± 0,12	4,17 ± 0,65

**O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

§Viscosidade aparente do meio sem o microrganismo foi semelhante à viscosidade da água ($\eta_a = 1,23 \pm 0,03$ cP);

As análises foram realizadas em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Nos cultivos em biorreator não foi possível obter padrões de crescimento reprodutíveis. Devido a problemas gerais relacionados ao crescimento de organismos filamentosos em cultivo submerso, também foi considerado apropriado omitir a concentração de biomassa e a viscosidade aparente ao longo do tempo. Tais problemas ocorrem devido ao padrão de crescimento que muitas cepas fúngicas apresentam. Os fungos filamentosos crescem preferencialmente nas superfícies metálicas do biorreator desenvolvendo camadas grossas nas paredes e superfícies durante o cultivo submerso (KIM *et al.*, 2002). Esse fenômeno ocorre frequentemente devido à agregação das hifas longas e ramificadas em caldos de cultivo e consequente aderência às superfícies e formação de biofilmes (VECHT-LIFSHITZ; MAGDASSI; BRAUN, 1990). Assim, neste estudo, a morfologia fúngica foi avaliada juntamente com a concentração

final de biomassa e viscosidade aparente final e correlacionadas com a produção de corante vermelho e consumo de glicose. A produção de corante vermelho e o consumo de glicose durante a fermentação alterando a vazão de ar e a composição do meio do inóculo estão representados na **Figura 17**.

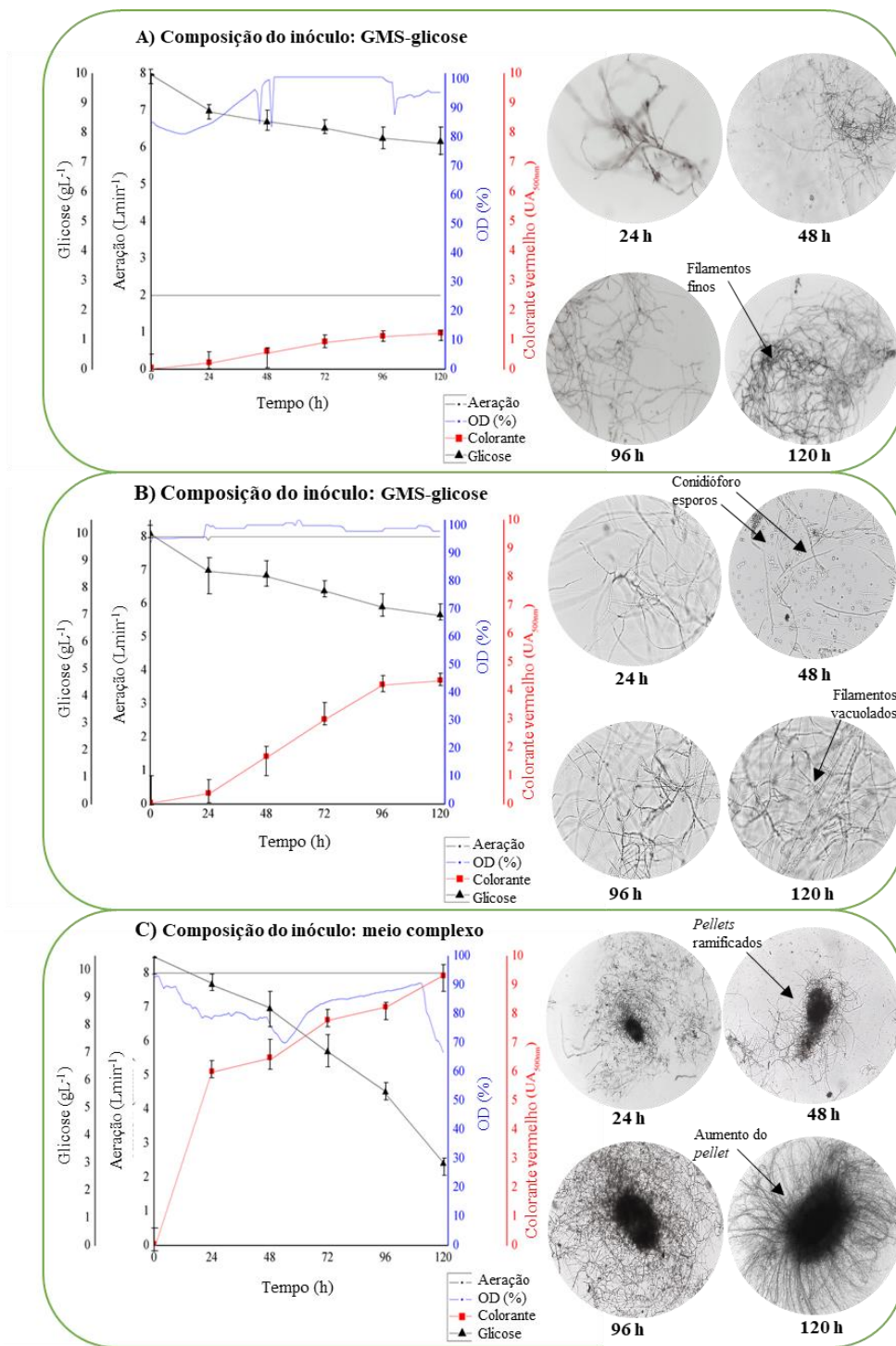


Figura 17. Cultivos do fungo *T. amestolkiae* em biorreator tanque agitado empregando **(A)** inóculo de composição GMS-glicose para vazão de ar de 2,0 Lmin⁻¹ e **(B)** 8,0 Lmin⁻¹; e **(C)** inóculo de composição complexa e taxa de aeração de 8,0 Lmin⁻¹ e suas respectivas estruturas macromorfológicas. Observação por microscopia de campo claro e ampliação de 100X. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e frequência de agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Com relação ao cultivo em que se empregou inóculo GMS-glicose, a produção de corante vermelho em 8,0 Lmin⁻¹ de aeração foi quase 3 vezes maior (4,37 UA_{500nm}, **Figura 17.B**) do que em 2,0 Lmin⁻¹ (1,24 UA_{500nm}, **Figura 17.A**), provavelmente devido à maior concentração de oxigênio dissolvido no meio. O aumento da vazão de ar não afetou significativamente o consumo de glicose, permanecendo abaixo de 30 % em ambas as condições (**Tabela 10**). O crescimento do microrganismo em cultivo em biorreator tanque agitado foi 62 % menor do que em agitador rotativo em 120 h de cultivo, sendo 1,02 gL⁻¹ contra 2,71 gL⁻¹, respectivamente. Assim, nessas condições, não foi possível alcançar a formação máxima de metabólitos. Devido ao efeito limitante que o meio contendo o GMS exerce sobre o crescimento do microrganismo, a viscosidade aparente provavelmente permaneceu constante durante o cultivo e as características morfológicas observadas na análise microscópica foram do tipo de hifa dispersa (**Figura 17.A e 17.B**). A pequena diferença entre a viscosidade (2,87 cP para 2,0 Lmin⁻¹ e 3,75 cP para 8,0 Lmin⁻¹) indicou que o aumento da aeração não favoreceu o crescimento fúngico ou alterou a morfologia das hifas dispersas do microrganismo, mas promoveu uma mudança no metabolismo do microrganismo aumentando a produção do corante vermelho. Por essa razão, 8,0 Lmin⁻¹ de vazão de ar foi utilizada no cultivo empregando o meio complexo no inóculo.

Durante o desenvolvimento de um processo para a produção máxima de corante, a padronização do nível de oxigênio dissolvido foi relatada como uma das variáveis mais importantes na síntese de corantes (ABDUL MANAN *et al.*, 2006; SUH; SHIN, 2000). Mohamed *et al.* (2012) relataram o efeito da aeração (de 0,75 a 3,0 Lmin⁻¹) na produção de corantes por *M. purpureus* em biorreator tanque agitado de 2 L. A melhor condição encontrada para a máxima produção do corante vermelho (24,36 UA_{500nm}) foi em 120 h de cultivo, 250 rpm e 2,25 Lmin⁻¹ de aeração. Esses autores também utilizaram o meio GMS-glicose, no entanto, eles não controlaram o pH durante o cultivo. O pH inicial foi de 6,5 e aumentou ligeiramente para 7,1 no final da fermentação. Algumas espécies de *Monascus* divergem das espécies de *Talaromyces* em termos de pH ideal para síntese de corante vermelho. Em *Monascus*, os corantes vermelhos são geralmente formados em pH 6,5, enquanto a síntese de corantes laranjas é favorecida em valores de pH abaixo de 4,0 (OROZCO; KILIKIAN, 2008; SHI *et*

al., 2015). Cho *et al.* (2002) relataram rendimento máximo de corante vermelho ($4,73 \text{ gL}^{-1}$) de *Paecilomyces sinclairii* em biorreator tanque agitado de 5 L e 3,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto), o que está de acordo com a dependência de oxigênio da via metabólica de síntese de corantes fúngicos (SUH; SHIN, 2000).

Comparando os cultivos que empregaram meio GMS-glicose e o meio complexo na composição do inóculo, o meio complexo induziu maior produção de corante vermelho ($9,33 \text{ UA}_{500\text{nm}}$), consumo de glicose (72,38 %) e biomassa final ($4,53 \text{ gL}^{-1}$) durante o cultivo em biorreator (**Tabela 10**). Em termos de produção de corante vermelho, isso representa um aumento de 31 % em relação à melhor condição em agitador rotativo (meio GMS-glicose e 120 h de cultivo em agitador rotativo, **Figura 16.A**). Esses resultados comprovaram a hipótese de que trabalhar com meios complexos na composição do inóculo para o cultivo em biorreator (a fim de aumentar a carga do inóculo) e empregando o meio GMS-glicose na composição do meio de cultivo (a fim de restringir o crescimento elevado em biorreator e aumentar a síntese de corante vermelho solúvel em água) pode ser vantajoso em escala industrial. Dessa forma, a concentração de biomassa e a taxa de consumo de glicose foram correlacionadas com a composição do inóculo. Ademais, trabalhar com o meio complexo no inóculo não acarretou aumento de viscosidade no biorreator. Uma vez que o inóculo que levou meio complexo em sua composição foi transferido para o biorreator, o efeito limitante do GMS, contido no vaso do biorreator, sobre o crescimento manteve o crescimento em nível intermediário. Como já reportado na literatura, as correlações entre as variáveis: concentração de biomassa, morfologia do microrganismo e viscosidade do meio não são fáceis de serem elucidadas (WUCHERPFENNIG; LAKOWITZ; KRULL, 2013).

No cultivo de fungos filamentosos, a morfologia celular é especialmente importante. O crescimento dos fungos foi baixo na cultura GMS-glicose ($1,23 \text{ gL}^{-1}$ em 24 h de cultivo em agitador rotativo, **Figura 16.A**) e durante os cultivos em biorreator, independentemente da vazão de ar, mantendo a viscosidade baixa e o nível de OD alto. O meio complexo na composição do inóculo favoreceu o crescimento do microrganismo ($7,23 \text{ gL}^{-1}$ em 48 h de cultivo em agitador rotativo, **Figura 16.B**). O inóculo mais denso resultou em crescimento intermediário durante o cultivo em biorreator. A pré-cultura na morfologia de *pellets* resultou

em crescimento do microrganismo em *pellets* ramificados no biorreator, sem apresentar grande quantidade de crescimento de hifas densas e longas (**Figura 17.C**). O tamanho do diâmetro dos *pellets* aumentou ao longo do cultivo, enquanto a concentração de biomassa permaneceu em nível moderado, provavelmente pelo efeito sinérgico do GMS e pH agindo como fatores de estresse. O objetivo era equilibrar o crescimento celular evitando problemas de transferência de massa e promover a produção de colorantes. A produção de colorantes iniciou logo nas primeiras 24 h de cultivo; no entanto, cerca de 30 % da glicose permaneceu no meio. Assim, o bioprocesso pode ser melhorado para aumentar o consumo de carbono.

Uma vez que *pellets* foram formados no inóculo, essa forma morfológica permaneceu durante todo o cultivo em biorreator. A morfologia dos *pellets* ramificados não afetou significativamente a reologia do caldo, pois a viscosidade aparente foi mantida em 4,17 cP no final do cultivo. As suspensões de *pellets* são muito menos viscosas, pois as hifas agregadas geralmente exercem menos influência sobre as propriedades de escoamento do caldo de cultivo (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). O crescimento fúngico na forma de *pellets* é geralmente preferido no cultivo submerso de fungos filamentosos. O fenômeno do desenvolvimento fúngico em *pellets* é uma das áreas mais estudadas nos trabalhos baseados em cultivo de fungos filamentosos. Isso se deve às vantagens que os *pellets* apresentam sobre a morfologia filamentosa, como a facilidade de separação do caldo de cultivo nas etapas *downstream*. Além disso, o crescimento filamentoso facilita a aderência do micélio nas superfícies metálicas do biorreator dificultando a homogeneidade do caldo de cultivo e a produção e excreção de metabólitos por fungos filamentosos (DITTMANN *et al.*, 2019).

Ao que tudo indica tanto os *pellets* de pequeno diâmetro quanto as hifas curtas representam as morfologias mais adequadas para síntese de colorante. Principalmente porque nesses estados morfológicos o fungo não sofre problemas de transferência de massa. No caso do fungo *M. purpureus* sjs-6 crescido em meio de amido de milho e amônia, a formação de biomassa foi maior em pH ácido do que em pH quase neutro e a alta concentração de biomassa foi relacionada com os maiores rendimentos de colorante amarelo (LV *et al.*, 2017). Com relação à morfologia, *pellets* foram formados tanto em pH ácido (3,0-5,0)

apresentando pequenos *pellets* dispersos, quanto em pH quase neutro (pH 6,0-8,0) apresentando agregação de *pellets* maiores. Esses autores relataram que tamanhos reduzidos dos *pellets* estão relacionados com maiores rendimentos dos colorantes amarelos, pois nessa morfologia a transferência de oxigênio/nutriente do meio líquido ao núcleo central do *pellet* é facilitada. Em concordância, Kim *et al.* (2002) estudaram o crescimento de *Monascus* sp. J101 em GMS-glicose acrescido de extrato de levedura em pH 6,6, o que favoreceu enormemente a formação de biomassa. Para reduzir a viscosidade do caldo de cultivo e problemas de transferência de massa no biorreator de 5 L, a agitação e a vazão de ar foram avaliadas visando a produção de fragmentos de micélios curtos e aumentar o consumo de oxigênio pela célula e a produção de colorantes. Após 120 h, 500 rpm e 1,0 vvm de vazão de ar, os colorantes vermelhos foram extraídos com etanol do meio de cultivo rendendo 220 UA_{510nm}. Com relação a outros fungos produtores de colorantes, Mapari, Meyer; Thrane (2008) estudaram quatro cepas de *Epicoccum nigrum* e relataram que a morfologia dos *pellets* favorecem a produção de colorante em *E. nigrum* IBT 41028. Nanou; Roukas (2016) relataram um aumento significativo na produção de carotenoides devido à mudança na morfologia do fungo *Blakeslea trispora* de micélios ramificados para *pellets*.

Portanto, a produção de colorantes por *T. amestolkiae* é dependente das condições nutricionais e ambientais. A produção de colorante aumentou sob condições de limitação de nutrientes e estresses externos. O GMS e o pH ambiental (especificamente pH de 5,0) desempenharam um papel importante no estresse metabólico, afetando o crescimento celular e a produção de colorantes. Dessa forma, a concentração de biomassa e o consumo de glicose no cultivo em biorreator foram correlacionadas com o meio do inóculo. O principal efeito da composição do meio do inóculo foi sobre o estado morfológico do fungo. Além disso, a formação de *pellets* favoreceu a oxigenação adequada do caldo de cultivo levando ao melhor metabolismo da fonte de carbono. Portanto, nos próximos experimentos, o inóculo de composição de meio complexo foi empregado para avaliar o efeito do tipo de impelidor utilizado para agitação do caldo de cultivo sobre a aeração e produção de colorante vermelho. Para tanto, buscou-se caracterizar a transferência de oxigênio no biorreator para dois tipos

de impelidores (turbina Rushton e orelha de elefante), a fim de se ajustar a melhor condição hidrodinâmica do biorreator.

5.6.2 Caracterização da capacidade de transferência de oxigênio dos impelidores

Para poder correlacionar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) com o crescimento do microrganismo e produção de colorante, o k_{La} foi calculado para o meio de cultivo chamado k_{La} referência, ou seja, meio GMS-glicose sem o microrganismo, em várias condições de oxigenação a 100 rpm de frequência de rotação. Dessa forma, para obter dados quantitativos de capacidade de transferência de oxigênio no interior do vaso de fermentação para cada tipo de impelidor (turbina Rushton e orelha de elefante) no início da fermentação, o k_{La} fornece informações importantes. O k_{La} em função da aeração dada em vvm para os dois tipos de impelidores está apresentado na **Figura 18**. As medições foram realizadas a 100 rpm, 30 °C e utilizando o meio de cultivo GMS-glicose sem o microrganismo.

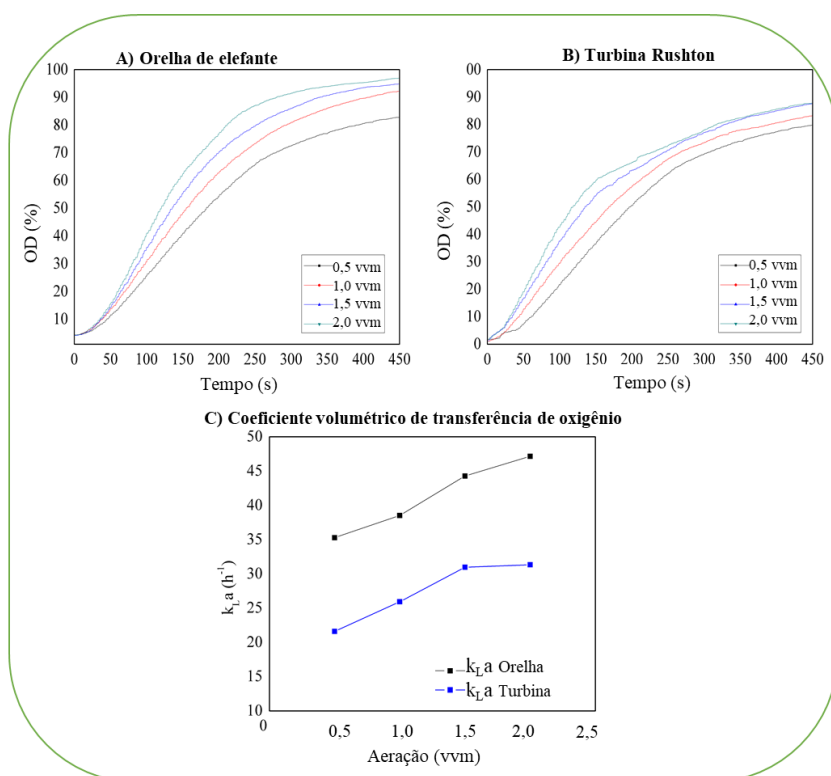


Figura 18. Determinação da saturação do oxigênio dissolvido para os dois tipos de impelidores: **(A)** orelha de elefante e **(B)** turbina Rushton a 100 rpm, 30 °C em diferentes vazões de ar empregando o meio de cultivo GMS-glicose sem o

microrganismo. **(C)** Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) do meio GMS-glicose sem o microrganismo (k_{LA} referência) em função da vazão de ar, calculado a partir dos dados obtidos pelo método dinâmico.

Os valores de k_{LA} máximos calculados foram de $31,32 \text{ h}^{-1}$ e $47,16 \text{ h}^{-1}$ para as turbinas Rushton e orelhas de elefante a $2,0 \text{ vvm}$ de aeração, respectivamente (**Figura 18.C**). Para ambos os tipos de impelidores, o k_{LA} aumentou com o aumento da aeração. No entanto, para as turbinas Rushton, vazões de ar acima de $1,5 \text{ vvm}$ não provocaram melhora significativa na transferência de oxigênio. Os valores de k_{LA} foram mais elevados empregando os impelidores do tipo orelha de elefante em todas as vazões de ar avaliadas. A substituição das turbinas Rushton pelos impelidores orelha de elefante resultou em aumento significativo do k_{LA} em $50,57 \%$ para $2,0 \text{ vvm}$ de aeração. Buffo *et al.* (2016) descreveram que a configuração dos impelidores do tipo orelha de elefante apresentaram maior eficiência de transferência de massa, em torno de 68% , em comparação com as turbinas Rushton. Esses autores utilizaram uma solução $2,5 \%$ (m/m) de goma xantana como fluido não-Newtoniano, característico de caldos de cultura de fungos filamentosos.

Como mencionado na seção 5.5.1, a produção máxima de corante vermelho empregando as turbinas Rushton foi de $9,33 \text{ UA}_{500\text{nm}}$ após 120 h de cultivo e $8,0 \text{ Lmin}^{-1}$ ($2,0 \text{ vvm}$) de aeração constante. O meio complexo de cultivo foi inoculado com 30 discos de micélio por 100 mL de meio e transferido ao biorreator em uma razão de volume de 10% (v/v). Nessas condições, a exaustão da glicose não pôde ser alcançada, pois o consumo de glicose foi de cerca de 72% após 120 h de cultivo. Além disso, observou-se que o nível de oxigênio teve papel fundamental na síntese dos corantes. Desta forma, para melhorar tanto a produção de corante vermelho quanto o consumo de glicose, todos os cultivos dos próximos experimentos foram realizados por um período mais longo (168 h) e maior carga de discos de micélio no inóculo (45 discos de discos de micélio por 100 mL de meio de fonte complexa). Para isso, uma série de cultivos em biorreator foram realizados empregando uma estratégia de controle de vazão de ar (aeração em cascata e aeração constante) e variando o tipo de impelidor (turbina Rushton e orelha de elefante).

5.6.3 Experimentos em aeração em cascata

Inicialmente, a produção de corante vermelho foi avaliada empregando a estratégia de controle de vazão de ar por cascata, sendo essa variada de modo a manter a concentração de oxigênio dissolvido (OD) em 20, 50 ou 100 %. O pH, temperatura e frequência de agitação foram controlados a 5,0; 30 °C e 100 rpm, respectivamente. Os valores de k_{La} , biomassa final, corante vermelho, consumo de glicose e valores de viscosidade final de cada cultivo estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Cultivos em biorreator para produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* a 30 °C e 100 rpm. Valores obtidos ao final do cultivo (168 h).

Condição	Aeração (Lmin ⁻¹)	Controle de OD (%) [†]	Agitação (100 rpm)	K _L a (h ⁻¹)	Biomassa (gL ⁻¹)	Colorante vermelho UA _{500nm}	Consumo de glicose (% m/m) ^{**}	Viscosidade aparente (cP) [§]
Aeração em cascata	Cascata	20 %	Turbinas	-	3,13 ± 0,45	9,4 ± 0,03	42,9 ± 0,05	3,43 ± 0,95
	Cascata	50 %	Turbinas	-	4,41 ± 0,62	20,8 ± 0,08	74,7 ± 0,06	3,67 ± 0,76
	Cascata	100 %	Turbinas	-	4,28 ± 0,08	26,8 ± 0,02	89,8 ± 0,09	3,26 ± 0,23
	Cascata	100 %	Orelhas de Elefante	-	4,17 ± 0,23	20,7 ± 0,07	96,2 ± 0,12	4,54 ± 0,09
Aeração constante	4,0 Lmin ⁻¹	-	Turbinas	18,36	4,84 ± 0,12	26,4 ± 0,04	90,8 ± 0,06	3,75 ± 0,47
	4,0 Lmin ⁻¹	-	Orelhas de elefante	15,84	3,09 ± 0,07	28,7 ± 0,02	98,4 ± 0,08	5,88 ± 0,04

[†]Em relação com a saturação com o ar;

^{**}O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

[§]Viscosidade aparente do meio antes da inoculação foi semelhante à viscosidade da água ($\eta_a = 1,23 \pm 0,03$ cP);

As análises foram realizadas em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Esse conjunto de experimentos foi realizado para avaliar os perfis de oxigênio dissolvido quando os níveis de OD foram mantidos em cascata com a vazão de ar. Os experimentos operados em cascata a 30 °C, 100 rpm e empregando as turbinas Rushton foram feitos para avaliar a variação da vazão de ar fixando o nível de OD em 20, 50 e 100 % de saturação de ar (**Figura 19**).

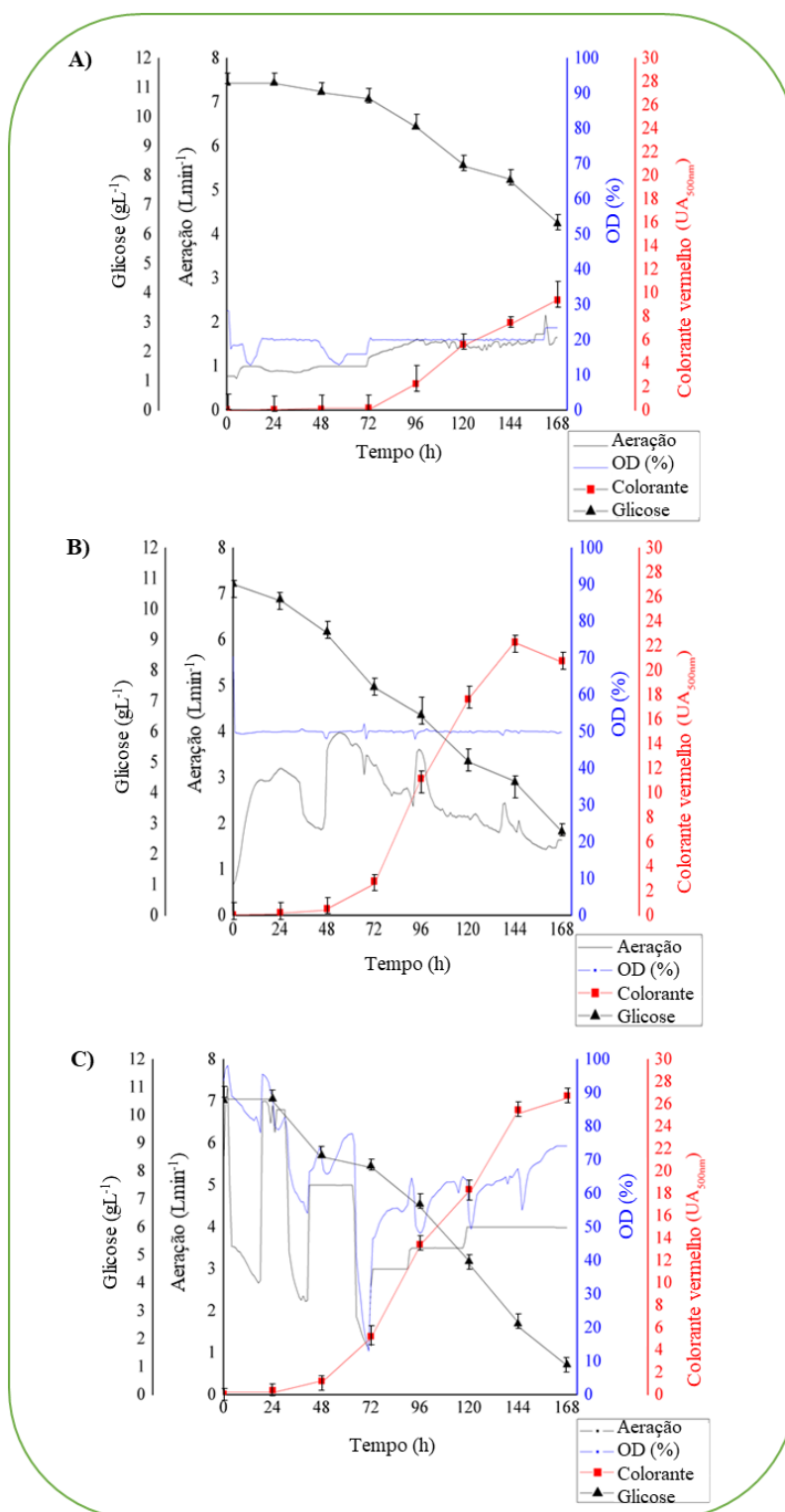


Figura 19. Cultivos em biorreator tanque agitado para os experimentos de controle de aeração em cascata empregando as turbinas Rushton. **(A)** Nível de OD definido em 20 % de saturação de ar; **(B)** nível de OD definido em 50 % de saturação de ar; **(C)** nível de OD definido em 100 % de saturação de ar. Todos os cultivos foram realizados a 30 °C e 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Após 24 h de cultivo em cascata a 20 % de saturação de ar, o fungo começou a se desenvolver, o que corresponde à queda no nível de OD nessa fase. A produção de colorantes começou após 72 h do processo, juntamente com um consumo mais rápido de glicose (**Figura 19.A**). Nesse ponto, a aeração aumentou de 1,0 para 1,5 Lmin⁻¹ para manter o OD em 20 %, e provavelmente em resposta ao crescimento do fungo, o que acarretou maior demanda de oxigênio a nível celular. A produção de colorante vermelho após 168 h de cultivo foi de $9,4 \pm 0,03$ UA_{500nm}. Com o aumento da saturação de ar de 20 para 50 e ~100 %, diminui-se o tempo de início da síntese de colorante vermelho. Para 50 % de saturação de ar, o colorante vermelho começou a ser sintetizado em fase logarítmica depois de 48 h de cultivo e foi excretado rapidamente até 144 h ($22,32 \pm 0,07$ UA_{500nm}) quando a fase de declínio começou (**Figura 19.B**). A atividade metabólica do fungo foi mais rápida e, assim, o consumo de glicose e a produção de colorante começaram antes, dentro de 48 h de cultivo. Em 144 h de cultivo, a produção de colorante diminuiu e, provavelmente, a atividade metabólica diminuiu, portanto, a demanda de oxigênio pode ter sido menor do que a taxa de transferência de oxigênio. Como consequência, vazões de ar menores foram necessárias para manter 50 % de oxigênio dissolvido.

A melhor condição para a produção de colorante vermelho ($26,8 \pm 0,02$ UA_{500nm}) foi alcançada para a máxima saturação de ar (**Figura 19.C**). No entanto, a vazão de ar e o OD variaram significativamente durante o processo fermentativo. Nas primeiras 72 h de cultivo, o OD permaneceu entre 80 e 90 %. Posteriormente, a vazão de ar e o OD foram mantidos acima de 3,0 Lmin⁻¹ e 50 %, respectivamente, e então a produção de colorante vermelho começou a aumentar rapidamente com o consumo de glicose. A condição de aeração em cascata na máxima saturação de oxigênio do ar foi o cultivo que apresentou maior dificuldade de operação. Não foi possível alcançar a taxa máxima de aeração (PID definido em 8,0 Lmin⁻¹), uma vez que o crescimento das hifas de micélio entupiu os orifícios do *sparger*, acionando o alarme de alta pressão do sistema de aeração. Consequentemente, a vazão de ar diminuiu para os valores mínimos do PID (definido em 0,5 Lmin⁻¹) juntamente com o nível de OD. Por essas razões, houve uma variabilidade grande de aeração para o experimento na máxima saturação de oxigênio do ar (OD em 100 % de saturação). Há complicações enfrentadas em cultivos de microrganismos filamentosos

operados em sistemas de controle automático, pois a morfologia do microrganismo filamentosos geralmente favorece a entrada dos filamentos finos de hifa no *sparger*, obstruindo os pequenos orifícios. Para vazões de ar menores que 4,0 Lmin⁻¹, a obstrução da saída de gás geralmente não causa alta pressão no sistema do *sparger*. No entanto, para vazões de ar maiores que 4,0 Lmin⁻¹, a obstrução da saída de gás causa aumento de pressão no sistema, acionando o sistema automático. Posteriormente, a vazão de ar é automaticamente reduzida para manter a pressão a valores moderados. Essa situação parece ser aleatória e relacionada à forma morfológica fúngica predominante no caldo de cultivo. Como as turbinas Rushton impõem altas tensões de cisalhamento ao micélio (DORAN, 2013), a fragmentação das hifas dispersas pode resultar em estruturas menores ou mais finas, facilitando a entrada dos filamentos nos orifícios do *sparger*.

Para avaliar a reprodutibilidade do perfil de OD, foi feita uma réplica da mesma condição (aeração em cascata a 100 % de saturação de ar empregando as turbinas Rushton). Como mencionado, houve obstrução da saída de gás e, portanto, aleatoriedade no perfil de aeração. Os perfis de aeração e OD ao longo do tempo estão apresentados na **Figura S2 do Material Suplementar**, e os resultados do cultivo estão apresentados na **Tabela S2 do Material Suplementar**. Na réplica desse experimento, a vazão de ar foi menor que 3,0 Lmin⁻¹ de 72 a 168 h, correspondendo à fase de maior velocidade para síntese de colorantes, levando à diminuição da produção de colorante vermelho em torno de 2 vezes. Além da variabilidade nos experimentos, esses resultados indicaram que manter a vazão de ar acima de 3,0 Lmin⁻¹ favorece a produção de colorante vermelho. Portanto, o oxigênio é um fator crucial para a síntese desse biocomposto. Para minimizar a variabilidade nos dados de um cultivo em cascata a 100 % de saturação de ar, deve-se considerar um ajuste nos termos do PID utilizados nos parâmetros do processo, porém, tais ajustes não foram abordados neste estudo.

De acordo com a literatura, o nível de oxigênio dissolvido no meio de cultivo foi relatado como uma das variáveis mais significativas na produção de colorantes de *Monascus* sp. (YANG *et al.*, 2015a). Ambos Hajjaj *et al.* (1999) e Pereira; Tonso; Kilikian (2008) relataram que em cultivo submerso, a produção de colorantes tende a aumentar com a concentração de oxigênio dissolvido. Isso

provavelmente é um efeito da homogeneidade de transferência de massa, em termos de substrato e oxigênio dissolvido, e energia. O aumento da aeração resultou em melhor padrão de mistura, mantendo assim um gradiente de concentração entre o meio líquido e o meio intracelular. Tal gradiente de concentração tende a facilitar os processos de difusão, facilitando a entrada de nutrientes para dentro das células e a saída de gases, produtos e coprodutos das células (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010).

Posteriormente, a produção de corante empregando os impelidores tipo orelha de elefante foi investigada na melhor condição de aeração em cascata, ou seja, OD definido em 100 % de saturação de oxigênio dissolvido (**Figura 20**).

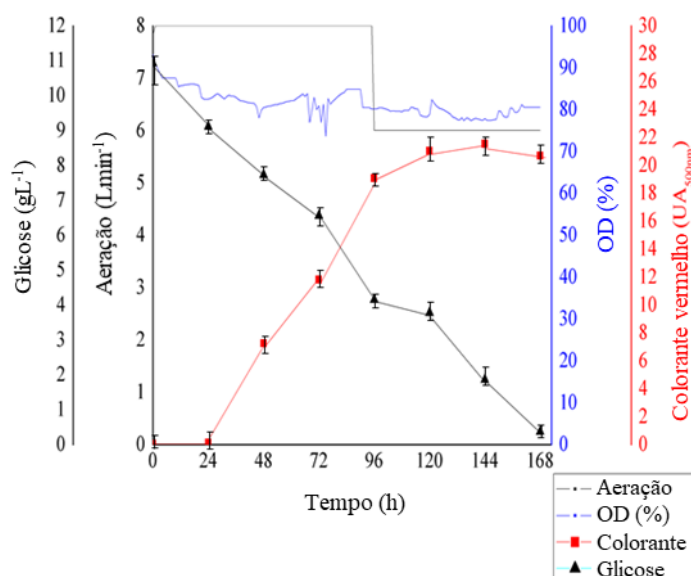


Figura 20. Cultivo em biorreator tanque agitado empregando os impelidores tipo orelha de elefante em controle de aeração em cascata com nível OD definido em 100 % de saturação de ar. O experimento foi realizado a 30 °C e frequência de agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Como a capacidade de transferência de oxigênio depende da geometria do impelidor, o sistema automático de aeração em cascata respondeu de forma diferente para cada impelidor. Nenhum problema técnico, como obstrução dos orifícios do *sparger* por finos filamentos de hifas, ocorreu com as orelhas de elefante. Isso se deve, provavelmente, à menor tensão de cisalhamento imposta ao microrganismo que esse tipo de impelidor oferece em comparação com a

turbina Rushton. Consequentemente, a vazão de ar foi mantida em valores mais elevados (entre 6,0 e 8,0 Lmin⁻¹) e o perfil de aeração e OD foram mais constantes ao longo do tempo, notavelmente afetando o desempenho geral do cultivo.

O cultivo com as orelhas de elefante foi mais progressivo em termos de produção de colorante e consumo de glicose; no entanto, a produção do colorante vermelho foi 23 % menor no final do cultivo quando comparado a obtida com as turbinas Rushton. Como a produção do colorante atingiu o máximo em torno de 120 h e permaneceu constante após esse tempo, o consumo de glicose foi 6,4 % maior no cultivo com as orelhas de elefante. Os estudos encontrados na literatura geralmente atribuem as mudanças no catabolismo da glicose às demandas biossintéticas do fungo para crescimento e desenvolvimento de biomassa (MAPARI *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2015). À medida que a glicose é catabolizada, o crescimento do microrganismo é acentuado. No entanto, não houve diferença entre a turbina Rushton e a orelha de elefante em termos de concentração de biomassa, o que provavelmente foi um efeito sinérgico da limitação de nutrientes associada ao meio GMS-glicose e do pH ácido (pH de 5,0 mantido pela adição automática de ácido ao longo do cultivo) agindo como fatores de estresse metabólico. Como mencionado anteriormente, a alta concentração de GMS pode estar associada à pressão osmótica e à permeabilidade da membrana, atuando como sistema regulador em condições de estresse metabólico, afetando assim o desenvolvimento fúngico. Como consequência, os colorantes produzidos usando o meio GMS-glicose são solúveis em água e são excretados para o meio extracelular.

De todos os fatores já mencionados, um outro fator que pode estar influenciando no rendimento do colorante vermelho é o tipo de impelidor empregado. A orelha de elefante proporciona um maior coeficiente de transferência de oxigênio do gás para o líquido (**Figura 18.C**). Uma hipótese é que altas concentrações de oxigênio molecular dissolvido no meio de cultivo pode criar um ambiente de estresse oxidativo, pois o oxigênio solúvel em água pode atacar o cromóforo dos colorantes (PETERS; FREEMAN, 1996). Assim, a oxigenação do meio e mistura do meio eficientes influenciam a biossíntese do colorante. No entanto, é notável que manter a aeração acima de 4,0 Lmin⁻¹ não manteve a estabilidade do colorante vermelho solúvel no meio de cultivo, uma

vez que pode ter ocorrido degradação do cromóforo do colorante. Como a orelha de elefante detêm melhor capacidade de transferência de massa do que a turbina Rushton, o nível de OD foi mantido acima de 80 % (**Figura 20**). Pode ser possível que uma saturação de OD acima de 80 % favoreça a degradação oxidativa do cromóforo do colorante vermelho, que é a estrutura molecular responsável pela cor do respectivo colorante.

A partir do melhor experimento em cascata (100 % de saturação de ar e empregando as turbinas Rushton), pode-se concluir que em fase de maior velocidade de produção de colorante, a vazão de ar variou entre 3,0 e 4,0 Lmin⁻¹. Além disso, altas vazões de ar podem causar degradação do colorante vermelho. Nesse sentido, para os experimentos em aeração constante, a vazão de ar foi fixada em 4,0 Lmin⁻¹ para avaliar os efeitos dos dois tipos de impelidores na morfologia celular e excreção de colorante vermelho. A morfologia do fungo foi avaliada a partir de imagens obtidas por microscopia de campo claro das estruturas de *T. amestolkiae* sob ação dos dois tipos de impelidores avaliados.

5.6.4 Experimentos em aeração constante

A relação inerente entre as condições de agitação e aeração, a morfologia fúngica e a síntese de metabólitos secundários ainda é amplamente desconhecida. Os variados processos de fermentação de células fúngicas exigem uma morfologia específica para se obter altos rendimentos da molécula de interesse (CAIRNS *et al.*, 2019; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018). O uso de um impelidor inadequado pode aumentar a tensão de cisalhamento imposta ao microrganismo, o que pode danificar sua parede celular. Dessa forma, a geometria do impelidor determina as forças mecânicas que podem afetar a morfologia e o desempenho dos microrganismos em biorreator (AMANULLAH *et al.*, 1998; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015). A partir disso, a viabilidade comercial dos colorantes obtidos a partir de fungos filamentosos requer um aprofundado conhecimento de suas características microscópicas. Com isso, o efeito do tipo de impelidor na produção de colorante vermelho foi avaliado mantendo constante a vazão de ar em 4,0 Lmin⁻¹, como mostrado na **Figura 21**.

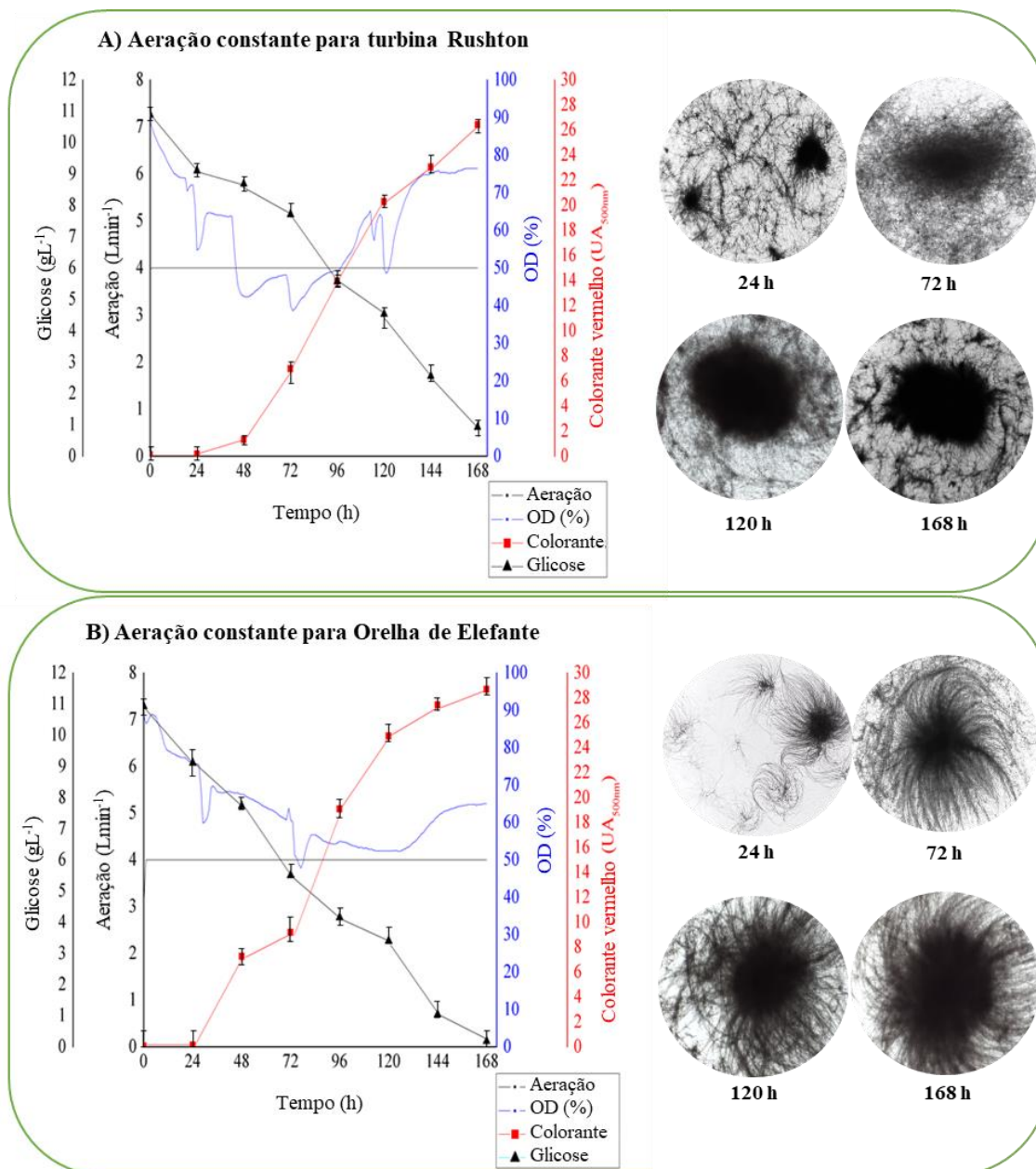


Figura 21. Cultivos em biorreator tanque agitado para aeração constante a $4,0 \text{ Lmin}^{-1}$; **(A)** experimentos empregando as turbinas Rushton e **(B)** impelidores tipo orelha de elefante, e sua observação de estruturas macromorfológicas por microscopia de campo claro, respectivamente. Ampliação de 100x. Todos os cultivos foram realizados a 30°C e uma frequência de agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Além da diferença no perfil de oxigênio dissolvido nos experimentos de aeração em cascata e aeração constante, as turbinas Rushton promoveram uma produção de colorante vermelho equivalente para ambas as condições de

aeração. Todos os outros parâmetros calculados também foram muito semelhantes. Isso provavelmente ocorreu devido a valores próximos de k_{LA} para ambos os sistemas. O k_{LA} não foi medido nos experimentos em cascata, porque nessas condições a vazão de ar varia ao longo do tempo. Ainda assim, deve-se notar que após 96 h de cultivo, a vazão de ar variou entre 3,5 e 4,0 Lmin⁻¹ para ambas as condições de aeração (**Figura 20.C e 22.A**). Portanto, em fase exponencial de síntese do colorante vermelho, o k_{LA} não deve ser muito diferente em ambas as condições de aeração. No entanto, operar o processo em aeração constante é vantajoso devido à reprodutibilidade em termos dos perfis de vazão de ar e oxigênio dissolvido e, portanto, rendimento do produto.

O cultivo com os impelidores tipo orelha de elefante resultou em maior produção de colorante vermelho ($28,7 \pm 0,02$ UA_{500nm}) e consumo de glicose ($98,4 \pm 0,08\%$). Nesse caso, a forma como os cultivos foram realizados teve efeito significativo na produção do colorante. Após 72 h, o nível de OD foi menor (entre 50 e 65 %) no experimento em aeração constante do que para o experimento em cascata (acima de 80 %). Curiosamente, ao se trabalhar com esse tipo de impelidor, a diminuição dos níveis de O₂ teve um efeito positivo na síntese de colorantes. Visto que o k_{LA} ao fim do cultivo com as orelhas de elefante foi 1,15 vezes menor do que ao fim do cultivo com as turbinas Rushton (**Tabela 11**), o perfil do rendimento de colorante vermelho versus k_{LA} parece ser hiperbólico.

Hajjaj *et al.* (1999) estudaram o crescimento e formação de metabólitos do fungo filamentoso *M. ruber* em meio GMS-glicose em diferentes vazões de ar. Esses autores também relataram que o aumento do k_{LA} , pelo aumento da vazão de ar de 0,06 para 0,6 Lmin⁻¹, resultou em uma melhor produção de colorante vermelho. Por outro lado, o aumento da aeração para 3,0 Lmin⁻¹ (2,0 vvm) não promoveu a produção de colorante, que se manteve constante. Além disso, a taxa máxima específica de produção de colorante vermelho foi alcançada em um tempo menor, para 2,0 vvm de aeração. Os autores correlacionaram o perfil hiperbólico da produção de colorante vermelho, juntamente com a taxa específica máxima de produção em um tempo menor, versus o k_{LA} com o fenômeno de inibição metabólica por coprodutos. Eles mediram três grandes coprodutos da fermentação de *M. ruber* (CO₂, etanol e malato). Entre esses coprodutos, o malato foi apontado como responsável pela

diminuição da síntese de corante por *M. ruber*, uma vez que o etanol é relatado como substrato na síntese de corante vermelho e o CO₂ não tem mostrado efeito sob a produção de corante por *M. ruber* (JUZLOVÁ *et al.*, 1994; PASTRANA *et al.*, 1995). Mais tarde, Hajjaj *et al.* (2000a) relataram que ácidos orgânicos, como o malato, produzidos durante o cultivo de *M. ruber* em condições de excesso de oxigênio podem ser os responsáveis na inibição da síntese de corantes. Esses autores concluíram que o efeito negativo do malato na síntese de corante provavelmente está associado às reações de esterificação entre o cromóforo policetídeo e o ácido graxo de cadeia média para formação dos corantes laranjas. Nesse sentido, o malato provavelmente teria efeito negativo na síntese de ácidos graxos.

No entanto, sabe-se que o acúmulo de acetil-CoA está relacionado com a síntese de corantes por estar envolvido tanto na síntese do cromóforo hexacetídeo (via de síntese de policetídeos), quanto na via de síntese do β -cetoácido derivado da via de síntese de ácidos graxos (YANG *et al.*, 2015b). Mudanças no fluxo metabólico do precursor acetil-CoA para outras vias metabólicas, como a via de biossíntese de aminoácidos e ciclo TCA, têm impacto na formação de metabólitos secundários (YU; KELLER, 2005). A entrada do acetil-CoA no ciclo TCA desviaria esse precursor das vias de síntese de policetídeos e ácidos graxos. Portanto, o acúmulo de malato, por ser um intermediário do ciclo TCA, pode ser um indicativo de que houve o desvio do acetil-CoA da rota de síntese do cromóforo para o ciclo TCA. Portanto, tudo indica que, provavelmente, o acúmulo de malato não é um inibidor da síntese de corantes, mas sim um indicativo importante de que ocorreu desvio da rota metabólica produtora do corante.

De todas as hipóteses mencionadas, um desvio de rota metabólica pode ser responsável pela diminuição da síntese de corante em cultivo de *T. amestolkiae*. No entanto, o malato não foi quantificado neste estudo e por isso não pôde ser especificamente relacionado com o desvio da rota metabólica e consequente diminuição da síntese de corante, como no trabalho de Hajjaj *et al.* (2000a). Ademais, as razões que levaram ao acúmulo de acetil-CoA e desvio de rota metabólica podem estar relacionadas com o efeito da alta disponibilidade de oxigênio no metabolismo fúngico. Portanto, o excesso de oxigênio pode favorecer a formação e acúmulo de algum outro coproduto não identificado e

envolvido no desvio da rota de síntese do colorante. Por outro lado, o ambiente altamente oxidativo pode causar a degradação do colorante vermelho solúvel no meio de cultivo.

Com relação ao crescimento, a biomassa final foi menor nos cultivos realizados com as orelhas de elefante ($3,09 \pm 0,07 \text{ gL}^{-1}$) do que nos cultivos com as turbinas Rushton ($4,84 \pm 0,12 \text{ gL}^{-1}$). Além de baixa concentração celular, o k_{La} foi menor no cultivo com as orelhas de elefante. Nos cultivos com as turbinas Rushton, a morfologia de *T. amestolkiae* observada foi de *pellets* densos e esféricos, enquanto para as orelhas de elefante foram observados *pellets* ramificados com maior número de ramificações de hifas longas (**Figura 21**), o que pode ter causado um ligeiro aumento na viscosidade em 1,56 vezes, correlacionado com o k_{La} menor (**Tabela 11**).

A morfologia fúngica é um parâmetro importante que afeta a produtividade dos colorantes (KIM *et al.*, 2002). Corroborando com nossos resultados, Mohamed *et al.* (2012) relataram que o grau de ramificação dos *pellets* em *M. purpureus* estão relacionados com melhor excreção de colorante em relação aos *pellets* densos e compactos. No entanto, os autores atribuíram os níveis de OD (abaixo de 50 %) ao crescimento elevado do microrganismo ($10,72 \text{ gL}^{-1}$), que leva ao aumento do consumo de oxigênio. Os *pellets* cercados por hifas dispersas, ou mais ramificados, são mais metabolicamente ativos do que os *pellets* lisos e densos, devido ao número de hifas longas externas (ESPINOSA-ORTIZ *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2002) relataram que a morfologia celular de *Monascus* afeta significativamente o caldo de cultivo em termos de viscosidade e, em última instância, os rendimentos do produto de interesse. Esses autores relataram que o rendimento máximo de colorante foi obtido na forma morfológica do fungo de hifas ramificadas e curtas, devido à menor viscosidade mantendo altos níveis de OD.

Como mencionado, as tensões de cisalhamento impostas ao microrganismo também atuam como parâmetro controlador da morfologia fúngica (BUFFO *et al.*, 2020). Em cultivos em biorreator tanque agitado, é provável que ocorra quebra das hifas em maior grau perto das pontas do impelidor, principalmente nas turbinas Rushton. Como as turbinas Rushton determinam maiores taxas de cisalhamento na ponta do agitador, a reologia do fluido nessas regiões é geralmente diferente da reologia das áreas próximas às

paredes do vaso do biorreator, onde as taxas de cisalhamento são menores (DORAN, 2013). Com isso, as turbinas Rushton podem determinar maiores taxas de cisalhamento, que poderiam causar danos ao micélio e favorecer a agregação das hifas, aumentando o diâmetro dos *pellets* ao longo do tempo (**Figura 21.A**). Como o interior dos *pellets* muitas vezes se tornam um ambiente anaeróbico e metabolicamente menos ativo em relação às regiões mais externas, a limitação de absorção de nutrientes e oxigênio e a toxicidade de coproduto é proporcionalmente mais acentuada em *pellets* de maior diâmetro (AMANULLAH *et al.*, 1998). Diante do exposto, as turbinas Rushton não se mostraram adequadas para promover a agitação de cultivos de *T. amestolkiae* visando a produção de colorantes.

O grau de ramificação na região externa dos *pellets* pode sofrer influência da tensão de cisalhamento imposta ao microrganismo, o que depende do tipo de impelidor empregado. Nos cultivos com as orelhas de elefante, a tensão de cisalhamento parece ser mais baixa resultando em *pellets* mais ramificados. Além disso, uma melhor transferência de massa e oxigenação do meio, devido à maior força motriz desse tipo de impelidor, pode ter permitido o crescimento e a extensão das hifas ao redor dos *pellets*. O aumento do diâmetro do *pellet* também foi observado ao longo do tempo no cultivo com as orelhas de elefante (**Figura 21.B**). Portanto, os *pellets* ramificados são preferidos nos cultivos celulares de *T. amestolkiae* porque a absorção de nutrientes e oxigênio é facilitada através da difusão. Tais fenômenos observados sugerem que a combinação do padrão de escoamento axial e radial que as orelhas de elefante exercem no caldo de cultivo pode ter resultado em uma tensão de cisalhamento menor em comparação à turbina Rushton, e promovido maior homogeneização e, assim, favoreceu a formação de ramificações mais longas no exterior dos *pellets* observados.

A orelha de elefante tem sido amplamente utilizada para cultivos de sistemas biológicos sensíveis ao cisalhamento imposto. Isso se deve às suas características como tamanho das pás e pelo fato de a borda das lâminas estar sempre no mesmo raio do eixo de impulsionamento do fluido. Essas características são responsáveis pela performance de baixa taxa de cisalhamento atribuída a esse tipo de impelidor (COLLIGNON *et al.*, 2010). Henzler (2000) relatou que impelidores com uma grande área de lâmina em

relação às dimensões do vaso do biorreator (como a orelha de elefante) produzem menos cisalhamento, devido à distribuição uniforme de energia no sistema. Buffo *et al.* (2016) avaliaram o desempenho de várias combinações diferentes das turbinas Rushton e das orelhas de elefante em biorreator tanque agitado. A combinação das duas orelhas de elefante nos modos descendente-ascendente foi o sistema mais adequado, apresentando taxas de cisalhamento em torno de 60 % menor do que para a configuração convencional utilizando duas turbinas Rushton.

Em resumo, o cultivo de microrganismos filamentosos enfrenta barreiras técnicas substanciais que impedem a consolidação do cultivo em larga escala. Essas limitações podem ser superadas pela melhor compreensão dos efeitos hidrodinâmicos dos biorreatores sobre as características microscópicas do fungo. Trabalhar com parâmetros fixos, como aeração constante, é importante para alcançar processos fermentativos eficientes com rendimentos previsíveis. A transferência de oxigênio para o líquido é um parâmetro-chave na produção de corante vermelho. No entanto, alta vazão de ar pode gerar um ambiente de estresse oxidativo e levar à degradação do cromóforo do corante vermelho.

Com relação ao desempenho das células fúngicas, o dano celular causado pelas orelhas de elefante parece ser menor comparado aos danos causados pelas turbinas Rushton, devido à tensão de cisalhamento imposta às hifas ramificadas dos *pellets*. Devido à maior transferência de massa e à menor taxa de cisalhamento das orelhas de elefante, os *pellets* tendem a ser mais ramificados facilitando a absorção de oxigênio/nutrientes. Finalmente, os resultados dos cultivos em biorreator tanque agitado sugerem que a morfologia celular e a vazão de ar são fatores significativos na síntese de corante, o que possibilitou um aumento de 23 vezes em relação ao início dos cultivos em biorreator e de 2,05 vezes em relação à melhor condição encontrada para a produção de corante vermelho em agitado rotativo.

5.7 Estudos de estabilidade

5.7.1 Mudança de cor por ação de ácido e base

O pH é um parâmetro importante para uma série de processos, desde a produção de alimentos até tingimento de roupas, assim, avaliou-se o efeito da variação do pH na cor dos colorantes naturais produzidos por *T. amestolkiae*.

Este estudo foi realizado com o colorante ainda no meio fermentado (sem nenhuma extração e/ou purificação) porque a depender do processo de aplicação do colorante não há a necessidade de extrair o colorante do meio fermentado antes de sua aplicação. A faixa estudada foi de pH 1,0 a 13 pela adição de HCl (1,0 M) ou NaOH (1,0 M). Os dados brutos estão apresentados na **Tabela S3 do Material Suplementar** e o resultado da estabilidade dos colorantes vermelhos ao longo do tempo está apresentado na **Figura 22**.

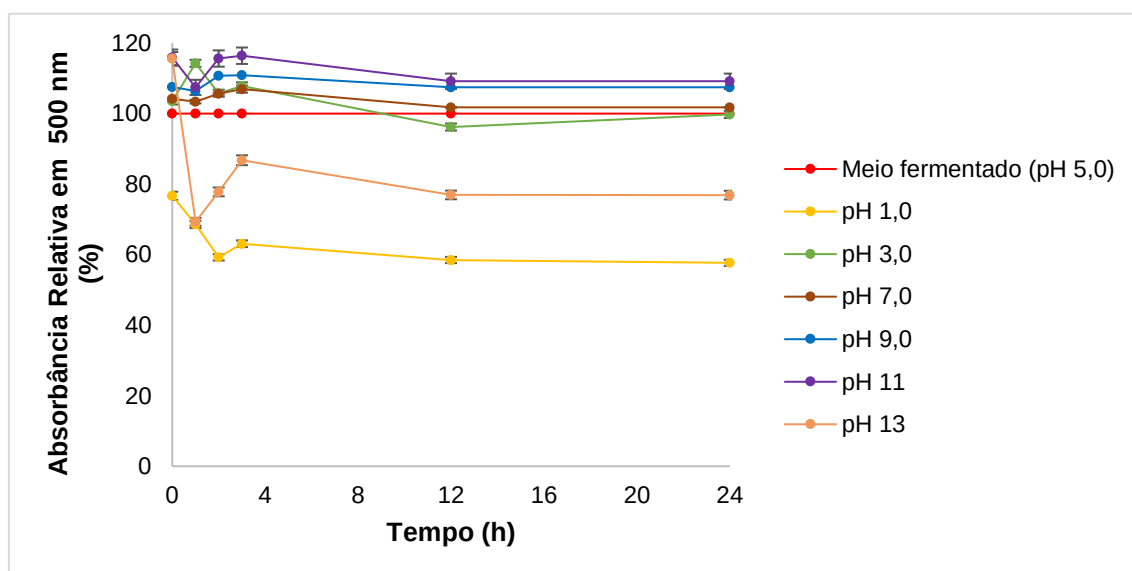


Figura 22. Estabilidade do colorante vermelho do meio fermentado ao longo do tempo. O pH foi alterado pela adição de HCl (1,0 M) ou NaOH (1,0 M). As amostras foram retiradas após 0, 1, 2, 3, 12 e 24 h de incubação a 25 °C. O meio fermentado, pH 5,0, foi considerado como controle dos ensaios e representa 100 % de absorbância em 500 nm ao longo do tempo. As barras de erro representam limites de confiança de 95 % para cada medida.

Analisando-se a **Figura 22**, pode-se identificar boa estabilidade dos colorantes vermelhos na faixa de pH entre 3,0 e 7,0 após 24 h de incubação. No entanto, houve aumento da absorbância nas condições básicas (pH 9,0 e 11). Comportamento diverso foi observado para as condições extremamente ácidas e/ou básicas (pH 1,0 e 13), apresentado queda da absorbância dos colorantes vermelhos ao longo do tempo.

As varreduras espectroscópicas do meio fermentado nos diferentes valores de pH e o espectro de fluorescência de cada uma das condições estão

representados na **Figura 23**. O pH inicial das condições avaliadas foi de 5,0, que representa o meio fermentado na condição inicial. Após 24 h de incubação na condição de pH desejada, que variou entre pH 1,0 e 13 por adição de ácido/base, retornou-se ao pH inicial do meio fermentado (pH 5,0), a fim de se obter dados sobre a reversibilidade de cor e fluorescência dos colorantes presentes no meio fermentado.

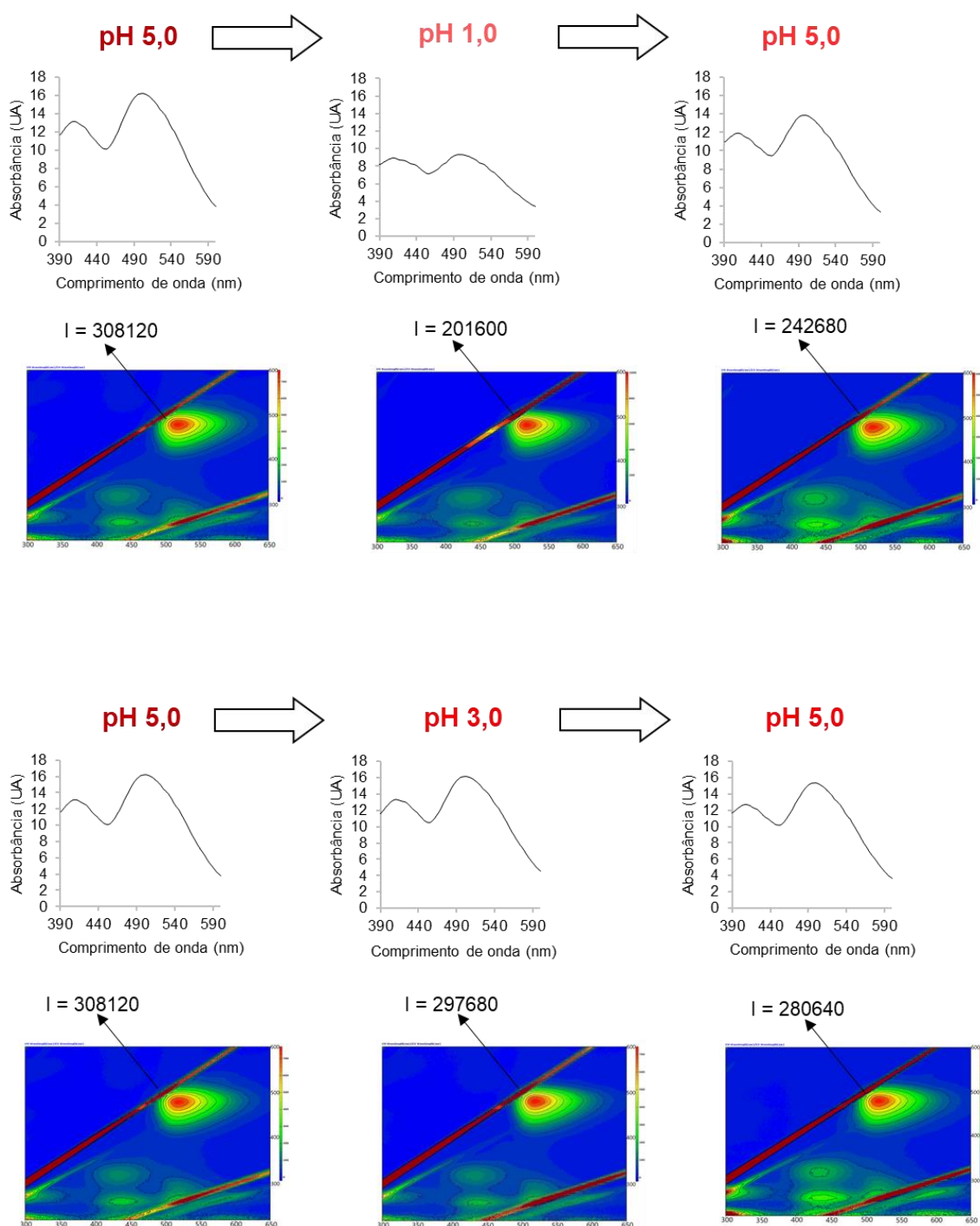


Figura 23 Continuação

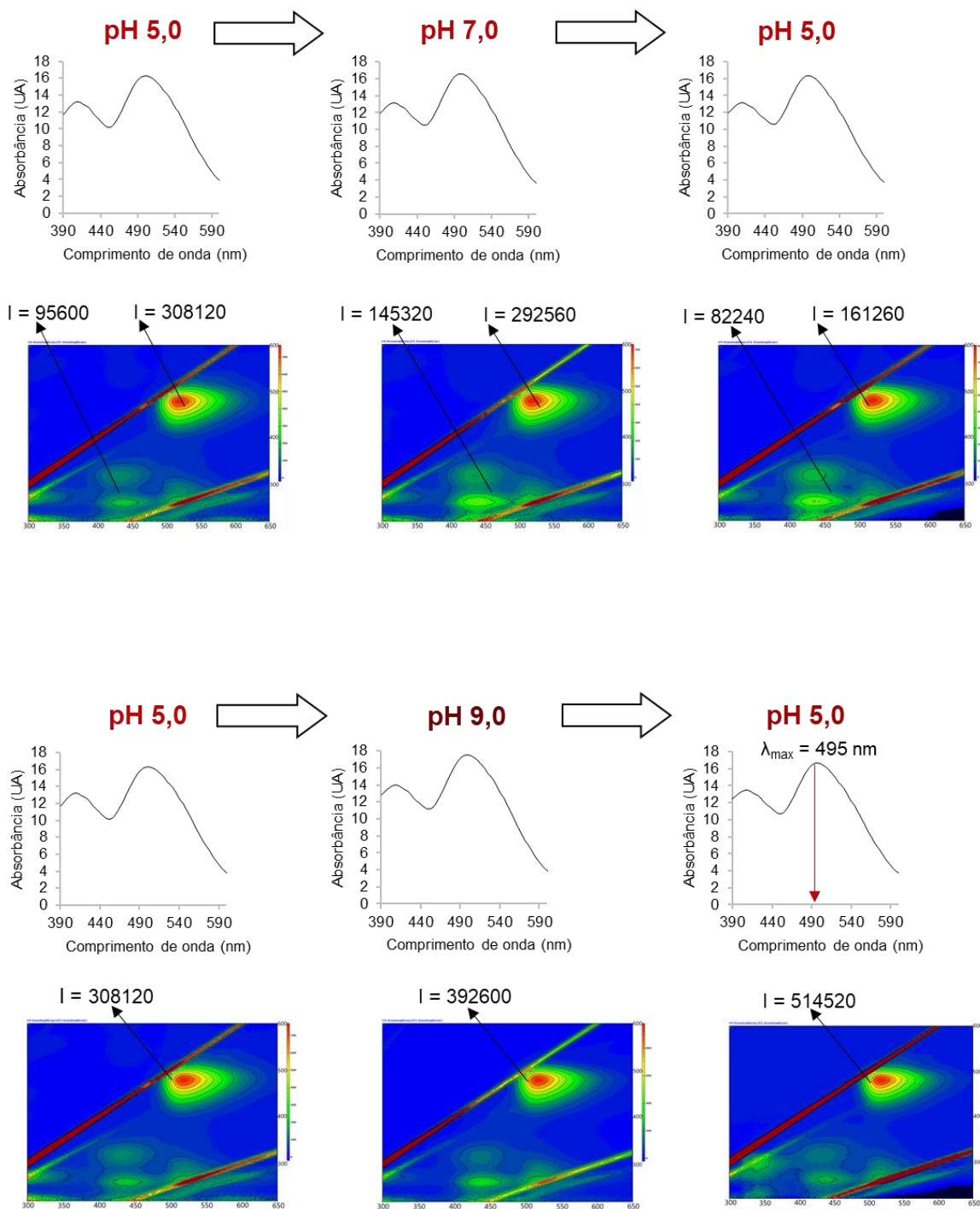


Figura 23 Continuação

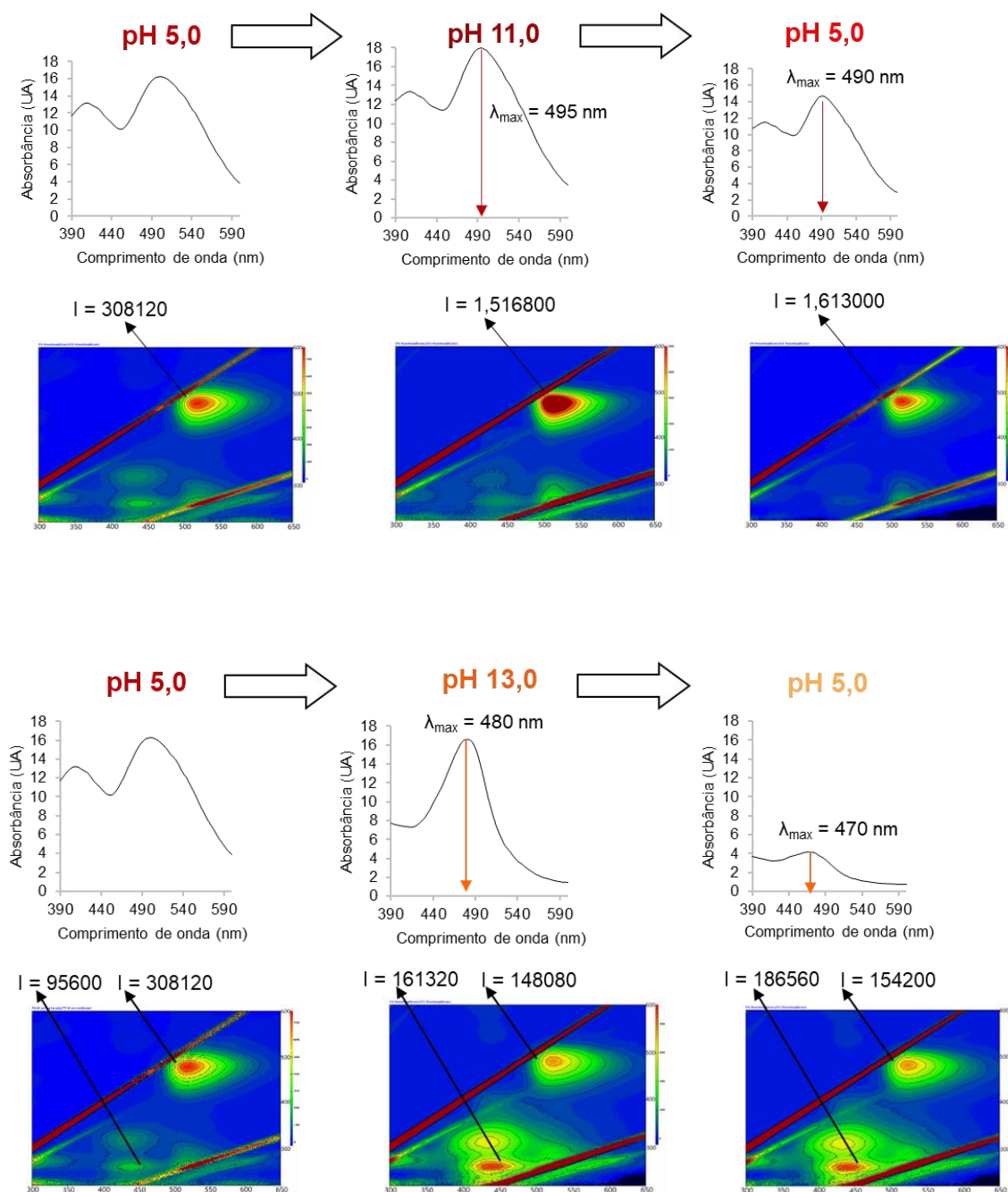


Figura 23. Propriedades espectroscópicas do meio fermentado de *T. amestolkiae* sob adição de HCl (1,0 M) e NaOH (1,0 M) após 24 h de incubação a 25 °C. O fator de diluição foi levado em consideração.

Além do espectro de absorção, os dados das análises de espectroscopia de fluorescência e colorimetria fornecem mais informações sobre a estabilidade de cada colorante presente no meio fermentado (amarelo, laranja e vermelho) (Figura 23).

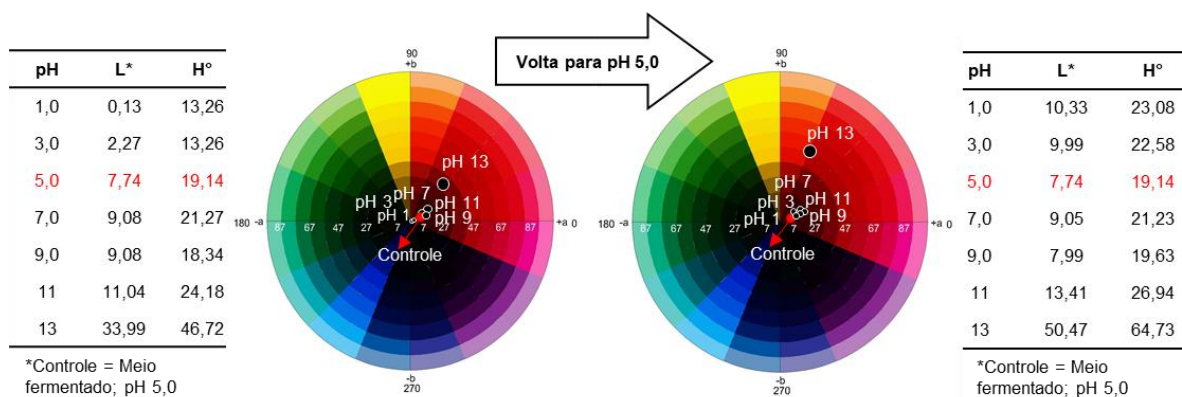


Figura 24. Mudança de cor no espaço de cores CIELAB para os colorantes produzidos por *T. amestolkiae* de todas as condições testadas após 24 h de incubação a 25 °C, mostrando os ângulos de matiz e croma nos valores L* de 0,13 a 50,47.

A mudança do pH de 5,0 para 1,0 levou a uma queda dos valores de luminosidade, ângulo de matiz, fluorescência e da absorbância tanto em 410 quanto em 470 e 500 nm. No entanto, quando se reverteu o pH para 5,0, os valores de luminosidade, ângulo de matiz, fluorescência e absorbância retornaram aos valores próximos aos iniciais (Figuras 23 e 24). Portanto, pode-se inferir que as moléculas dos colorantes não sofrem mudanças irreversíveis em suas estruturas quando expostas a condição extrema de acidez (pH 1,0). A diminuição da luminosidade e ângulo de matiz inferem que na verdade os colorantes sofreram precipitação reversível, pois os valores iniciais desses parâmetros são recuperados na volta do pH para 5,0. Já em pH 3,0, os colorantes aparentam estabilidade em relação à absorbância. No entanto, houve queda nos valores de luminosidade, ângulo de matiz e fluorescência. Assim como em pH 1,0, esses valores foram recuperados no retorno ao pH 5,0, com exceção do fluoróforo III.

Os colorantes apresentaram estabilidade em termos de absorbância em condição neutra (pH 7,0), em contrapartida ocorreram alterações nos valores de

luminosidade, ângulo de matiz e fluorescência. O ângulo de matiz aumentou em direção à região do laranja no espaço de cor, juntamente com o aumento da fluorescência dos fluoróforos I e II em detrimento ao fluoróforo III. Após o retorno, os valores de luminosidade e ângulo de matiz não retornaram aos valores iniciais, porém os fluoróforos I e II perderam intensidade de fluorescência, assim como o fluoróforo III.

Em condições básicas (pH 9,0 e 11), tanto a absorbância quanto a fluorescência aumentaram em relação às condições iniciais. No entanto, em pH 11 ocorreu deslocamento do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}} = 495 \text{ nm}$) e aumento no ângulo de matiz e luminosidade. Em pH 9,0 o deslocamento do comprimento de onda é visto apenas após o retorno para o pH 5,0. Esse efeito é expresso como um deslocamento batocrômico acompanhado por um efeito hipercrômico.

Os colorantes são compostos por um grupo de átomos responsáveis pela cor, chamados cromóforos, bem como por substituintes receptores ou doadores de elétrons. Esses substituintes causam ou intensificam a cor dos cromóforos e são chamados auxocromos. Os auxocromos podem influenciar o grupo cromóforo de várias maneiras, deslocando o comprimento de onda absorvido para um valor maior (deslocamento batocrômico) ou para um valor menor (deslocamento hipsocrômico) ou alterando a intensidade de absorção dos comprimentos de onda, de modo a aumentá-la (efeito hipercrômico) ou diminuí-la (efeito hipocrômico). Os cromóforos mais importantes a serem citados são: cromóforos azo ($-\text{N}=\text{N}-$), carbonila ($-\text{C}=\text{O}$), metino ($-\text{CH}=\text{}$), nitro ($-\text{NO}_2$) e grupos quinóides. Os auxocromos incluem: amina ($-\text{NH}_3$), carboxila ($-\text{COOH}$), sulfonato ($-\text{SO}_3\text{H}$) e hidroxila ($-\text{OH}$) (CHRISTIE, 2001; PINA *et al.*, 2012). Portanto, pode-se inferir que os íons OH^- e H^+ em solução influenciam a carga dos grupos auxocromos dos colorantes de modo a interferirem na intensidade e comprimento de onda absorvido, por conseguinte influenciam na cor destes.

As intensidades de fluorescência do fluoróforo III aumentaram significativamente em ambas as condições (pH 9,0 e 11) e apresentam valores ainda maiores após o retorno ao pH 5,0, o que também pode estar relacionado ao deslocamento batocrômico acompanhado do efeito hipercrômico. Em pH 11, o aumento da intensidade de fluorescência após o retorno do pH foi de mais de 5 vezes.

Sob condições fortemente básicas (pH 13), os colorantes amarelo e vermelho (410 e 500 nm, respectivamente) provavelmente foram transformados em colorantes laranjas, o que resultou em aumento na absorção a 480 nm e mudança de cor do vermelho para laranja, representada pelo aumento do ângulo de matiz 46,72 (**Figura 24**). A intensificação da fluorescência é vista apenas para fluoróforos I e II, mesmo após retorno ao pH 5,0. O fluoróforo III e o ângulo de matiz sofreram alterações irreversíveis, o que corrobora com a perda de colorantes vermelhos vista na espectroscopia visível (**Figura 23**). Bhardwaj *et al.* (2007) também observaram alteração da cor vermelha para laranja dos colorantes de *Penicillium marneffe* quando o pH foi alterado de 8,0 para 13.

O vermelho é uma das cores mais utilizadas em uma vasta gama de produtos, com destaque para os produtos alimentícios. Os principais colorantes vermelhos naturais incluem antocianinas, licopeno, betalaínas e carmim (GALAFFU; BORTLIK; MICHEL, 2015). As antocianinas são flavonoides e são caracterizadas pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio). Uma variedade de colorantes é necessária para cobrir todas as aplicações. Por exemplo, colorantes à base de antocianinas dão tons vermelhos em pH muito ácido e azul a verde em pH neutro (MELO; PINA; ANDARY, 2009), enquanto o carmim é estável em pH 5,0 e 7,0, mas é instável e pode precipitar em pH 3,0. O ácido carmínico é uma antraquinona solúvel em água. Sua cor muda com o pH: em ambientes ácidos é laranja, vermelho com acidez decrescente e violeta em condições alcalinas (GHIDOUCHE *et al.*, 2013).

A cor dos colorantes de *Monascus* varia de amarelo à laranja à vermelho. Os colorantes vermelhos de *Monascus* em solução são mais estáveis em pH próximo ao neutro e/ou alcalino (à 100 °C) e são menos estáveis que os colorantes amarelos (FABRE *et al.*, 1993; MAPARI *et al.*, 2009). Este efeito pode representar um problema para a aplicação dos colorantes de *Monascus* em alimentos ácidos. Carvalho *et al.* (2005) atribuíram este efeito à aceleração da interação da água com colorantes causada pelo ácido, ocorrendo a quebra de uma ligação éster na rubropunctamina ou monascorubramina (colorantes vermelhos). Em contraste, os colorantes vermelhos de *Talaromyces* apresentaram uma ampla estabilidade na faixa entre os valores de pH 3,0 a 9,0, o que os torna compatível com os produtos alimentícios ácidos e levemente básicos. Ademais, os colorantes de *Talaromyces* podem ser usados em uma

ampla faixa de pH sem apresentar mudança de coloração e instabilidade da molécula.

5.7.2 Mudança de cor por ação de sais

Assim como os íons H^+ e OH^- podem interagir com a estrutura química dos colorantes, os sais também podem exercer a mesma função. Na **Figura 25** estão representadas as alterações feitas no meio fermentado pela adição de 15 e 30 % (m/m) dos sais K_3PO_4 e $MnSO_4$ após 24 h de incubação a 25 °C. Esses sais foram selecionados porque em estudos de partição dos colorantes do meio fermentado de *T. amestolkiae* observou-se mudança de coloração do meio fermentado (dados não apresentados).

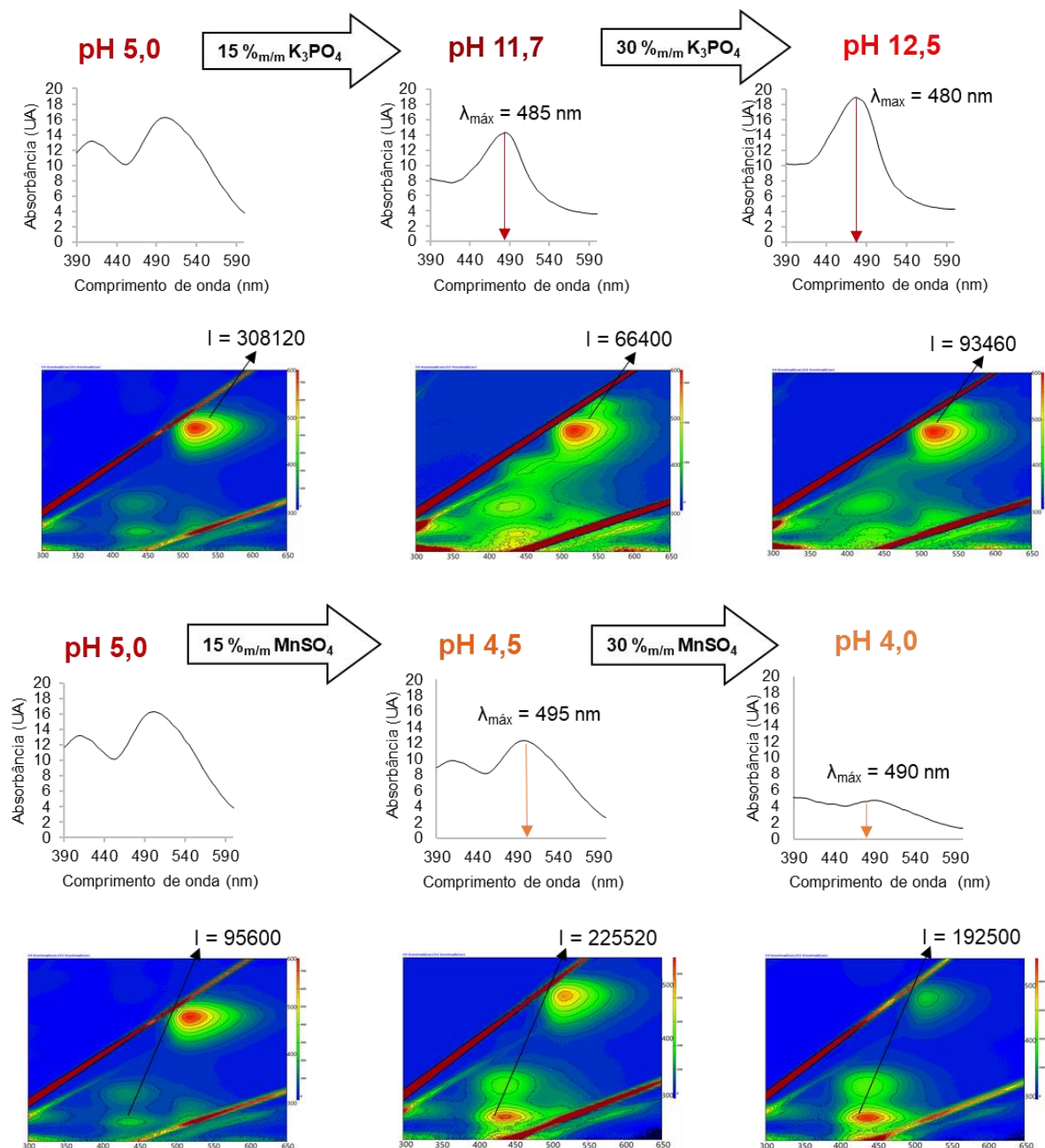


Figura 25. Propriedades espectroscópicas do meio fermentado de *T. amestolkiae* sob adição de K_3PO_4 e $MnSO_4$ (ambos 15 e 30 % m/m) após 24 h de incubação a 25 °C. O fator de diluição foi levado em consideração.

As interações dos colorantes com os sais parecem ser mais drásticas que as interações com os íons H^+ e OH^- . Após a adição de 15 e 30 % (m/m) de K_3PO_4 , o meio fermentado sofreu um aumento de pH de 5,0 para 11,7 e 12,5, respectivamente. Em ambas as concentrações, houve uma mudança imediata na cor vermelha devido à perda de $\lambda_{\text{máx}}$ em 410 e 500 nm e deslocamento

batocrômico acompanhado do efeito hipercrômico em 480 nm. Por conseguinte, os ângulos de matiz também sofreram deslocamento para a região do laranja (**Figura 26**). Ademais, as intensidades de fluorescência dos fluoróforos I e II aumentaram enquanto o fluoróforo III diminuiu.

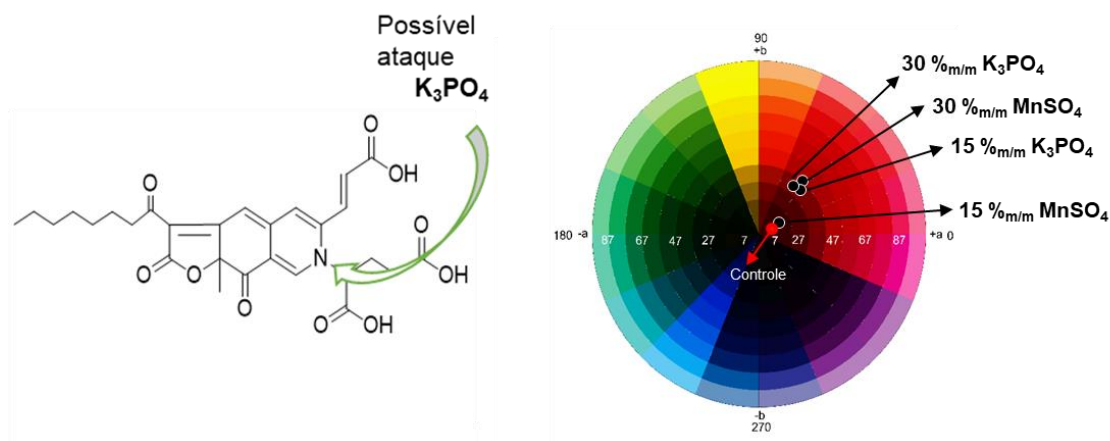


Figura 26. Representação do possível ataque do sal K₃PO₄ à molécula do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*, e mudança de cor no espaço de cores CIELAB para os colorantes produzidos por *T. amestolkiae* após adição de sais ao meio fermentado após 24 h de incubação a 25 °C.

A mudança do pH do meio fermentado pela adição de NaOH (1,0 M) para os valores 11 e 13 também resultou em desvio de $\lambda_{\text{máx}}$ com aumento da absorbância e aumento de fluorescência dos fluoróforos I e II em detrimento do fluoróforo III. No entanto, em termos de cor, maiores ângulos de matiz resultaram da adição de sal quando comparado com a adição de NaOH. Na presença do fosfato, a molécula do colorante vermelho provavelmente sofreu alterações na estrutura do cromóforo, levando ao rompimento das ligações duplas de carbono e possivelmente ataque do nitrogênio do anel em substituição a um átomo de oxigênio. As alterações no cromóforo dos colorantes vermelhos podem ser observadas no espectro de fluorescência do fluoróforo III que sofreu mudanças conformacionais.

A redução do pH pela adição de 15 e 30 % (m/m) de MnSO₄ resultou em diminuição para pH ~ 4,0, que foi suficiente para precipitar os colorantes, observada no aumento da luminosidade. Além da redução da absorbância, ocorreu desvio de $\lambda_{\text{máx}}$ para região de 490 nm resultando em aumento dos

valores de ângulo de matiz na direção da cor laranja. Portanto, os grupos auxocromos podem ter sofrido alterações. Em comparação com as interações dos colorantes com o ácido, pode-se observar que em pH 1,0 e 3,0 não ocorreu deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ e a cor vermelha foi intensificada pela redução da luminosidade. Pode-se concluir que com adição de MnSO_4 , os colorantes vermelhos são majoritariamente precipitados, enquanto os colorantes amarelo e laranja ficam em solução, o que pode ser observado nos valores dos fluoróforos I e II que aumentam em relação ao meio fermentado.

Conclusões

- Em cultivos em agitador rotativo, várias tonalidades de colorantes amarelo, laranja e vermelho foram obtidas a partir da alteração do pH e da composição do meio. Em substituição às fontes complexas de nitrogênio (peptona de carne e extrato de carne), ideais para o crescimento e desenvolvimento do fungo, a produção de colorante aumentou sob condições de limitação de nutrientes e estresses externos. Após aumento de 30 vezes na produção em agitador rotativo, o colorante vermelho do meio fermentado apresentou intensa fluorescência amarela.
- A suplementação do meio GSM-glicose não foi significativa na produção do colorante vermelho. Após 168 h de cultivo em agitador rotativo usando o meio GSM-glicose, a glicose foi completamente esgotada e o crescimento do fungo atingiu o máximo, alcançando a formação metabólica máxima. Já em meio contendo fonte complexa de nitrogênio, o crescimento do fungo foi elevado e na forma morfológica de *pellets*, no entanto, a produção de colorante foi baixa e a viscosidade aparente do caldo de cultivo foi elevada.
- Em cultivos em biorreator tanque agitado, o aumento da carga do inóculo, pelo uso de fontes complexas na composição do meio do inóculo, aumentou a produção de colorante vermelho. Dessa forma, a concentração de biomassa e o consumo de glicose foram correlacionados com o meio de cultura do inóculo. O principal efeito da composição do meio de cultura foi sobre o crescimento e estado morfológico do fungo.
- Utilizar o meio GSM-glicose no cultivo em biorreator possibilitou controlar o crescimento fúngico mantendo baixa a viscosidade aparente do caldo de cultivo, o que possibilitou evitar problemas de transferência de massa e energia dentro do biorreator. Além disso, a formação de *pellets* favoreceu a oxigenação do caldo de cultivo levando ao melhor metabolismo da fonte de carbono.
- Com relação à estratégia de controle de aeração, o sistema de aeração constante foi vantajoso devido à reprodutibilidade em termos de perfil de vazão de ar e, portanto, do rendimento do produto. Ademais, constatou-se que apesar de ser reportado que *T. amestolkiae* demanda altas concentrações de oxigênio para seu metabolismo celular, a produção de

colorantes foi maior em condições de média disponibilidade de oxigênio, uma vez que altas concentrações de oxigênio molecular dissolvido pode levar à degradação do cromóforo dos colorantes.

- O tipo do impelidor empregado foi correlacionado com o desempenho celular, através da tensão de cisalhamento imposta ao microrganismo. O grau de ramificação na região externa dos *pellets* sofreu influência da tensão de cisalhamento imposta ao microrganismo. *Pellets* menores e mais ramificados foram observados para o cultivo agitado com as orelhas de elefante, o que foi correlacionado com a maior produção de colorante vermelho. Em contrapartida, *pellets* maiores e menos ramificados foram observados para as turbinas Rushton, devido à maior tensão de cisalhamento imposta.
- O emprego da orelha de elefante aumentou a produção do colorante vermelho, resultando em uma produção de 28,7 UA_{500nm}. Em termos de produção de colorante vermelho, isso representa um aumento de 2,05 vezes em relação à melhor condição em agitador rotativo e de 23 vezes em relação ao início dos cultivos em biorreator.
- Os estudos de estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado em relação ao pH e sais demonstraram que os colorantes são estáveis em relação à cor em uma ampla faixa de valores de pH, porém podem precipitar ou perder as características de cor relacionadas à estrutura química do cromóforo quando sais são adicionados. Ainda, os colorantes vermelhos podem ser usados para projetar produtos distintos, principalmente em condição ácida.

Como conclusão final, este trabalho demonstrou que a produção de colorantes por *T. amestolkiae* é altamente dependente das condições nutricionais e ambientais e não tem relação com altas velocidades de crescimento do microrganismo, sendo que o GMS e o pH ambiental (pH 5,0) desempenharam um papel importante no estresse metabólico afetando o crescimento celular e a produção e excreção de colorantes. Além disso, foi possível o aumento de escala de processo, que consiste em uma característica interessante para aplicação industrial dos colorantes produzidos por *T. amestolkiae*.

Bibliografia

ABDUL MANAN, M. et al. Aeration and agitation strategies for the improvement of red pigment production by *Monascus purpureus* FTC 5391. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 34, n. 1, p. 89–102, 2006.

ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 71–78, 2011.

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J.-H. Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 35–54, 1998.

AMANULLAH, A. et al. The influence of impeller type in pilot scale Xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 1, p. 95–108, 1998.

AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 914–922, 2015.

ARAI, T. et al. Importance of the ammonia assimilation by *penicillium purpurogenum* in amino derivative *Monascus* pigment, PP-V, production. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2013.

ATKIN, L. et al. Yeast microbiological methods for determination of vitamins: Pantothenic acid. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 67–71, 1944.

BADINO, A. C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients (kLa) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 2, p. 111–119, 2001.

BAREITHER, R. et al. Automated disposable small scale reactor for high throughput bioprocess development: A proof of concept study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 12, p. 3126–3138, 2013.

BENJAMIN, C. R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologia**, v. 47, n. 5, p. 669–687, 1955.

BHARDWAJ, S. et al. Putative structure and characteristics of a red water-soluble pigment secreted by *Penicillium marneffe*. **Medical Mycology**, v. 45, n. 5, p. 419–427, 2007.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 208–215, 2005.

BLANCH, H. W.; BHAVARAJU, S. M. Non-Newtonian fermentation broths: Rheology and mass transfer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 18, n. 6, p. 745–790, 1976.

BOO, H. O. et al. Extraction and characterization of some natural plant pigments. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 1, p. 129–135, 2012.

BUFFO, M. M. et al. Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 130–139, 2016.

- BUFFO, M. M. et al. Relation between pellet fragmentation kinetics and cellulolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in conventional bioreactor with different impellers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 139, n. April, 2020.
- CAIRNS, T. C. et al. Moulding the mould: Understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2019.
- CARELS, M.; SHEPHERD, D. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 1360–1372, 1977.
- CARO, Y. et al. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 2, n. 5, p. 174–193, 2012.
- CARO, Y. et al. Pigments and Colorants from Filamentous Fungi. In: **Fungal Metabolites**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1–70.
- CHADNI, Z. et al. Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. **Mycology**, v. 8, n. 1, p. 48–57, 2017.
- CHEN, G. et al. Correlation of pigment production with mycelium morphology in extractive fermentation of *Monascus anka* GIM 3.592. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 42–50, 2017a.
- CHEN, G.; WU, Z. Production and biological activities of yellow pigments from *Monascus* fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 8, 2016.
- CHEN, M. H.; JOHNS, M. R. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 132–138, 1993.
- CHEN, W. et al. Orange, red, yellow: Biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. **Chemical Science**, v. 8, n. 7, p. 4917–4925, 2017b.
- CHEN, W. et al. Nature and nurture: Confluence of pathway determinism with metabolic and chemical serendipity diversifies: *Monascus* azaphilone pigments. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 4, p. 561–572, 2019.
- CHO, Y. J. et al. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 13–23, 2002.
- CHOI, D. B.; PARK, E. Y.; OKABE, M. Dependence of apparent viscosity on mycelial morphology of *Streptomyces fradiae* culture in various nitrogen sources. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 4, p. 525–532, 2000.
- CHRISTIANA, N. O. Production of food colourants by filamentous fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 26, p. 960–971, 2016.
- CHRISTIE, R. M. **Colour chemistry**. 1. ed. Cambridge, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 2001.

CLYDESDALE, F. M. Color Perception and Food Quality. **Journal of Food Quality**, v. 14, n. 1, p. 61–74, 1991.

COKER, A. K. **Fluid Mixing in Reactor. Em: Modeling of Chemical Kinetics and Reactor Design**. 1. ed. Houston, Texas: Gulf Publishing Company, 2001.

COLLIGNON, M. L. et al. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors: Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 22, p. 5929–5941, 2010.

CORRÊIA GOMES, D.; TAKAHASHI, J. A. Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. **Food Chemistry**, v. 210, p. 355–361, 2016.

DDW, C. H. **Industry Poll Indicates Natural Red Is a Technically Challenging Hue**. Louisville, KY: DDW Colour House. <http://www.ddwcolor.com/industry-poll-indicates-natural-red-is-a-technicallychallenging-hue>. Acesso em 25/09/2020, 2013.

DE CARVALHO, J. C. et al. Biopigments from *Monascus*: Strains selection, citrinin production and color stability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 885–894, 2005.

DE MEJIA, E. G. et al. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. annurev-food-032519-051729, 2020.

DE OLIVEIRA, C. F. D.; DA COSTA, J. P. V.; VENDRUSCOLO, F. Maltose syrup residue as the substrate for *Monascus* pigments production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, n. January, p. 101101, 2019.

DE OLIVEIRA, F. et al. *Talaromyces amestolkiae* cell disruption and colorant extraction using imidazolium-based ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, p. 117759, 2020.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Natural colorants for food and nutraceutical uses**. [s.l: s.n.].

DITTMANN, J. et al. The influence of salt-enhanced cultivation on the micromechanical behaviour of filamentous pellets. **Biochemical Engineering Journal**, v. 148, n. February, p. 65–76, 2019.

DORAN, P. 8.1 Functions of Mixing. **Bioprocess Engineering Principles**, p. 255–332, 2013.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 5–22, 2000.

DUFOSSE, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 9, p. 389–406, 2005.

DUFOSSE, L. Microbial production of food grade pigments. **Food Technology**

and Biotechnology, v. 44, n. 3, p. 313–321, 2006.

DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.

DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, n. April 2017, p. 156–161, 2018.

DURAN, R.; CARY, J. W.; CALVO, A. M. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 367–381, 2010.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, p. 225–261, 2007.

ESPINOSA-ORTIZ, E. J. et al. Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 553–571, 2016.

EVANS, P. J.; WANG, H. Y. Pigment production from immobilized *Monascus* sp. utilizing polymeric resin adsorption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1323–1326, 1984.

FABRE, C. E. et al. Production and Food Applications of the Red Pigments of *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 5, p. 1099–1102, 1993.

FRISVAD, J. C. et al. *Talaromyces atrovirens*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–15, 2013.

GALACTION, A. I. et al. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, n. 1, p. 85–94, 2004.

GALAFFU, N.; BORTLIK, K.; MICHEL, M. **An industry perspective on natural food colour stability**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015.

GAO, J.; YANG, S.; QIN, J. *Azaphilones: Chemistry and Biology*. 2012.

GARCÍA-ESTRADA, C. et al. Transcription factors controlling primary and secondary metabolism in filamentous fungi: The β -lactam paradigm. **Fermentation**, v. 4, n. 2, 2018.

GARCIA-OCHOA, F. et al. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 289–307, 2010.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009.

GHIDOUCHE, S. et al. A Rapid tool for the stability assessment of natural food colours. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 978–985, 2013.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in

submerged culture: Problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 2000.

GILL, N. K. et al. Design and characterisation of a miniature stirred bioreactor system for parallel microbial fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 164–176, 2008.

GLOBAL INFO RESEARCH. **Global Natural Colorant (Natural Pigment) Consumption Market Report (2020)**, 2020. Disponível em: <<https://www.360researchreports.com/enquiry/request-sample/12985558>>. Accessed 13 July 2020>

GMOSER, R. et al. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1–25, 2017.

GOGATE, P. R.; BEENACKERS, A. A. C. M.; PANDIT, A. B. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: A critical review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 109–144, 2000.

GOMEZ, E. et al. Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 138–146, 2015.

GRIMM, L. H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 375–384, 2005.

HAJJAJ, H. et al. Production and identification of N-glucosylrubropunctamine and N- glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2671–2678, 1997.

HAJJAJ, H. et al. Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, n. 4, p. 497–501, 1999.

HAJJAJ, H. et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 619–625, 2000a.

HAJJAJ, H. et al. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1120–1125, 2000b.

HAJJAJ, H. et al. Effect of Amino Acids on Red Pigments and Citrinin Production in *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 3, p. 156–159, 2012.

HENZLER, H. J. Particle stress in bioreactors. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 67, p. 35–82, 2000.

HOLLAND, F. A.; BRAGG, R. **Fluid flow for chemical engineers**. 2. ed. [s.l.] F. A. Holland, R. Bragg, 1995.

HSU, Y. W. et al. New bioactive orange pigments with yellow fluorescence from *Monascus*-fermented *dioscorea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4512–4518, 2011.

HU, X. C. et al. The roles of different salts and a novel osmotic pressure control strategy for improvement of DHA production by *Schizochytrium* sp. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 11, p. 2129–2136, 2015.

HUANG, Z. et al. Structural characterization of two new orange pigments with strong yellow fluorescence. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. 140–144, 2014.

ISBRANDT, T. et al. Atorosins: a new subgroup of *Monascus* pigments from *Talaromyces atrovirens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 615–622, 2019.

ISMAEL, R.; SCHWANDER, H.; HENDRIX, P. Fluorescent Dyes and Pigments. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 1–22.

JUNG, H. et al. Color characteristics of *monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1302–1306, 2003.

JUZLOVÁ, P. et al. Ethanol as substrate for pigment production by the fungus *Monascus purpureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 996–1001, 1994.

KALLSCHEUER, N. Engineered microorganisms for the production of food additives approved by the European Union-A systematic analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–20, 2018.

KANG, B. et al. Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 50–57, 2014.

KEEKAN, K. K. et al. Antioxidant Activity and Role of Culture Condition in the Optimization of Red Pigment Production by *Talaromyces purpureogenus* KKP Through Response Surface Methodology. **Current Microbiology**, n. 0123456789, 2020.

KIM, D.; KU, S. Beneficial effects of *Monascus* sp. KCCM 10093 pigments and derivatives: A mini review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1–15, 2018.

KIM, H. J. et al. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 649–655, 2002.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 93–99, 2011.

KONICA MINOLTA, S. A. **Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*a*b***. Disponível em: <http://sensing.konicaminolta.com.br/2015/08/compreendendo-o-espaco-de-cor- cie-lch>. Acesso em 28/09/2020, 2020.

KRAIRAK, S. et al. Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus* sp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 363–367, 2000.

KRASNIEWSKI, I. et al. Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1318–1324,

2006.

KRIVORUCHKO, A. et al. Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 28, p. 28–42, 2015.

KUMAR, P.; DUBEY, K. K. Mycelium transformation of *Streptomyces toxytricini* into pellet: Role of culture conditions and kinetics. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 339–347, 2017.

KUMAR, S.; PUNEKAR, N. S. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. **Mycological Research**, v. 101, n. 4, p. 403–409, 1997.

LAGASHETTI, A. C. et al. Fungal pigments and their prospects in different industries. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 1–36, 2019.

LAKOWICZ, J. R.; LAKOWICZ, J. R. Protein Fluorescence. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, p. 341–381, 1983.

LAKSHMI, C. Food Coloring: The Natural Way. **Research Journal of Chemical Sciences Res. J. Chem. Sci**, v. 4, n. 2, p. 2231–606, 2014.

LEE, B. K. et al. Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 5, p. 341–346, 2001.

LIN, P. J.; SCHOLZ, A.; KRULL, R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 213–220, 2010.

LIN, T. F. et al. Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, n. 3–4, p. 173–179, 1992.

LIN, T. F.; DEMAINE, A. L. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 70–75, 1991.

LIN, T. F.; DEMAINE, A. L. Leucine interference in the production of water-soluble red *Monascus* pigments. **Archives of Microbiology**, v. 162, n. 1–2, p. 114–119, jul. 1994.

LORET, M. O.; SANDRINE, M. Isolation and structural characterization of two new metabolites from *monascus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1800–1803, 2010.

LV, J. et al. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 452–458, 2017.

MAPARI, S. A. et al. Production of *Monascus*-like azaphilone pigment- Patent EP 2 262 862 B1. v. 1, n. WO 2009/026923 (05.03.2009 Gazette 2009/10), p. 1–41, 2012.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231–238, 2005.

- MAPARI, S. A. S. et al. Computerized screening for novel producers of Monascus-like food pigments in *Penicillium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9981–9989, 2008.
- MAPARI, S. A. S. et al. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1–15, 2009.
- MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7027–7035, 2006.
- MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 12, p. 2183–2190, 2008.
- MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6253–6261, 2009.
- MAPARI, S. A. S.; THRANE, U.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300–307, 2010.
- MARKET INSIGHTS. **Global Natural Colorant (Natural Pigment) Market Insights, Forecast to 2025 (2020)**., 2020. Disponível em: <<https://www.360marketupdates.com/enquiry/request-sample/13720643>>.
- MARKET RESEARCH, N. M. I. **2017 Health & Wellness Trends in America**. Disponível em: <https://www.marketresearch.com/Natural-Marketing-Institute-v1549/Health-Wellness-Trends-America-10785112/>. Acesso em 09/10/2020, 2020.
- MAVITUNA, F. Strategies for Bioreactor Scale-Up. In: **Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996. p. 125–142.
- MEITZ, A. et al. An integrated downstream process development strategy along QbD principles. **Bioengineering**, v. 1, n. 4, p. 213–230, 2014.
- MELO, M. J.; PINA, F.; ANDARY, C. Anthocyanins: Nature's Glamorous Palette. **Handbook of Natural Colorants**, p. 135–150, 2009.
- MÉNDEZ, A. et al. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 12, n. 12, p. 961–968, 2011.
- MIYAKE, T. et al. Analysis of pigment compositions in various monascus cultures. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 2, p. 194–197, 2008.
- MOHAMED, M. S. et al. Enhancement of Red Pigment Production by *Monascus purpureus* FTC 5391 through Retrofitting of Helical Ribbon Impeller in Stirred-Tank Fermenter. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 1, p. 80–91, 2012.

- MORALES-OYERVIDES, L. et al. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces*/*Penicillium*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 43, p. 107601, 2020.
- MUKHERJEE, G.; SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 188–192, 2011.
- MUSONI, M. et al. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: From traditional methods to engineered systems. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 19, n. 4, p. 430–442, 2015.
- NANOU, K.; ROUKAS, T. Waste cooking oil: A new substrate for carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 198–203, 2016.
- NARSING RAO, M. P.; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–13, 2017.
- NIENOW, A. W. Impeller Selection for Animal Cell Culture. In: **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 1–12.
- OBÓN, J. M. et al. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 471–479, 2009.
- OKONKOWSKI, J. et al. Development of a robust, versatile, and scalable inoculum train for the production of a DNA vaccine. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1038–1047, 2005.
- OLIVEIRA, F. DE et al. Microbial colorants production in stirred-tank bioreactor and their incorporation in an alternative food packaging biomaterial. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 2020.
- OLSVIK, E.; KRISTIANSEN, B. Rheology of filamentous fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 12, n. 1, p. 1–39, 1994.
- OROZCO, S. F. B.; KILIKIAN, B. V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 263–268, 2008.
- OVERY, D. et al. Does osmotic stress affect natural product expression in fungi? **Marine Drugs**, v. 15, n. 8, 2017.
- PANDIT, S. G. et al. Functional attributes of a new molecule-2-hydroxymethylbenzoic acid 2'-hydroxy-tetradecyl ester isolated from *Talaromyces purpureogenus* CFRM02. **Food Chemistry**, v. 255, n. October 2017, p. 89–96, 2018.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger*

in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1–12, 2006.

PASTRANA, L. et al. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 333–341, 1995.

PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; PATROVSKY, M. *Monascus* Secondary Metabolites. In: **Fungal Metabolites**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 821–851.

PEREIRA, D. G.; TONSO, A.; KILIKIAN, B. V. Effect of dissolved oxygen concentration on red pigment and citrinin production by *Monascus purpureus* ATCC 36928. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 2, p. 247–253, 2008.

PETERS, A. T.; FREEMAN, H. S. Physico-chemical principles of color chemistry. **Physico-chemical principles of color chemistry**, v. 4, n. 0, p. 6221, 1996.

PINA, F. et al. Chemistry and applications of flavylum compounds: A handful of colours. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 2, p. 869–908, 2012.

PITT, J. I. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **Academic Press Inc, London**, v. 21, n. 8, p. 629–629, 1979.

PITT, J. I. **Penicillium: Penicillium and Talaromyces: Introduction**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 3

PLACKETT RL AND BURMAN J . P. THE DESIGN OF OPTIMUM MULTIFACTORIAL EXPERIMENTS Design of optimum multifactorial experiments Suppose also that the extreme value of x_i under consideration is x_i . Then the main effect of. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes Artificiais Em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 237–250, 2003.

QUINTANILLA, D. et al. Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production—Modelling and Monitoring. In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. [s.l.: s.n.]. v. 123p. 29–54.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 20–26, 2016.

SÁ, M. et al. 2D Fluorescence spectroscopy for monitoring *Dunaliella salina* concentration and integrity during membrane harvesting. **Algal Research**, v. 24, n. April, p. 325–332, 2017.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159–183, 2011.

SANTOS-EBINUMA, V. C. et al. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 778–785,

2013.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; PESSOA, A. Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorants by a new isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 802–810, 2013.

SARON, C.; FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124–128, 2006.

SCHMIDELL, W. et al. Biotecnologia industrial Volume 2. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, v. 2, p. 541, 2001.

SCOTTER, M. J. Emerging and persistent issues with artificial food colours: natural colour additives as alternatives to synthetic colours in food and drink. **Quality Assurance and Safety of Crops and Foods**, v. 3, n. 1, p. 28–39, 2011.

SEN, T.; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. March, p. 1–14, 2019.

SERRANO-CARREÓN, L. et al. Hydrodynamics, Fungal Physiology, and Morphology. In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. [s.l.: s.n.]. v. 123p. 55–90.

SHAH, S. G. et al. *Penicillium verruculosum* SG: A source of polyketide and bioactive compounds with varying cytotoxic activities against normal and cancer lines. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 4, p. 267–278, 2014.

SHI, K. et al. Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 2, p. 145–154, 2015.

SHI, K. et al. Improved analysis of *Monascus* pigments based on their pH-sensitive UV-Vis absorption and reactivity properties. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 33, n. 9, p. 1396–1401, 2016.

SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. December 2016, p. 261–280, 2017.

SIMONOT, L.; THOURY, M.; DELANEY, J. Extension of the Kubelka–Munk theory for fluorescent turbid media to a nonopaque layer on a background. **Journal of the Optical Society of America A**, v. 28, n. 7, p. 1349, 2011.

SINGH, S. Impact of color on marketing. **Management Decision**, v. 44, n. 6, p. 783–789, 2006.

STADLER, M. et al. Novel Bioactive Azaphilones from Fruit Bodies and Mycelial Cultures of the Ascomycete *Bulgaria inquinans* (Fr.). **Natural Product Letters**, v. 7, n. 1, p. 7–14, 4 ago. 1995.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. [s.l.] Elsevier, 1995.

- STOWE, R. A.; MAYER, R. P. Efficient screening of process variables. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 36–40, 1966.
- STRUBE, J. et al. Process development and design of downstream processes. **Chemie-Ingenieur-Technik**, v. 83, n. 7, p. 1044–1065, 2011.
- SUH, J. H.; SHIN, C. S. Physiological analysis on novel coculture of *Monascus* sp. J101 with *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 241–245, 2000.
- TEIXEIRA, M. F. S. et al. Amazonian biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their Toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6, n. 3, p. 300–311, 2012.
- TERÁN HILARES, R. et al. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, v. 245, p. 786–791, 2018.
- TOLBORG, G. et al. Unique processes yielding pure azaphilones in *Talaromyces atrovirens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 603–613, 2020.
- TORREGROSA-CRESPO, J. et al. Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, 2018.
- TORRES, F. A. E. et al. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511–2521, 2016.
- TUDOR, D.; ROBINSON, S. C.; COOPER, P. A. The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 80, p. 22–28, 2013.
- TUDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 1–16, 2014.
- TULI, H. S. et al. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015.
- VECHT-LIFSHITZ, S. E.; MAGDASSI, S.; BRAUN, S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 9, p. 890–896, 1990.
- VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 2997–3006, 2018.
- VELMURUGAN, P. et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262–268, 2010.
- VENDRUSCOLO, F. et al. Determination of Oxygen Solubility in Liquid Media. **ISRN Chemical Engineering**, v. 2012, p. 1–5, 2012.
- VENDRUSCOLO, F. et al. *Monascus*: a Reality on the Production and

Application of Microbial Pigments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 211–223, 2016a.

VENDRUSCOLO, F. et al. Isoelectric point of amino acid: Importance for monascus pigment production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, n. December, p. 179–185, 2016b.

VENIL, C. K. et al. Current perspective on bacterial pigments: Emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation. **RSC Advances**, v. 4, n. 74, p. 39523–39529, 2014.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065–1079, 2013.

VENKATACHALAM, M. et al. Production of pigments from the tropical marine-derived fungi *Talaromyces albobiverticillius*: New resources for natural red-colored metabolites. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, n. April 2017, p. 35–48, 2018.

VENKATACHALAM, M. et al. Salinity and temperature influence growth and pigment production in the marine-derived fungal strain *Talaromyces albobiverticillius* 30548. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2019.

VENTURA, S. P. M. et al. Isolation of natural red colorants from fermented broth using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 5, p. 507–516, 2013.

VINHA, A. F. et al. **Natural pigments and colorants in foods and beverages**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

WEI, W. G.; YAO, Z. J. Synthesis studies toward chloroazaphilone and vinylogous γ -pyridones: Two common natural product core structures. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 4585–4590, 2005.

WEINBERG, E. D. Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism. **Biology of Metals**, v. 2, n. 4, p. 191–196, 1990.

WIBOWO, S. et al. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. **Food Chemistry**, v. 171, p. 330–340, 2015.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, n. 9, p. 298–302, 1996.

WONG, H.-C.; KOEHLER, P. E. Production of Red Water-Soluble *Monascus* Pigments. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 4, p. 1200–1203, jul. 1983.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 59–77, 2012.

WUCHERPFENNIG, T.; LAKOWITZ, A.; KRULL, R. Comprehension of viscous morphology-Evaluation of fractal and conventional parameters for rheological characterization of *Aspergillus niger* culture broth. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 124–132, 2013.

XIONG, X. et al. Coupled aminophilic reaction and directed metabolic channeling to red *Monascus* pigments by extractive fermentation in nonionic

surfactant micelle aqueous solution. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 180–187, 2015.

YANG, J. et al. Effect of oxygen supply on *Monascus* pigments and citrinin production in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 5, p. 564–569, 2015a.

YANG, Y. et al. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8331, 2015b.

YILMAZ, N. et al. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, n. 1, p. 39–54, 31 dez. 2012.

YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 114, p. 437–458, 2005.

YU, L. et al. Hydrodynamic and kinetic study of cellulase production by *Trichoderma reesei* with pellet morphology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 7, p. 1755–1768, 2012.

ZACCARIM, B. R. et al. Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from amazon: A producer of natural colorants. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, 2018.

ZHANG, J.; ZHANG, J. The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1066–1077, 2016.

ZHONG, J. J. Recent advances in bioreactor engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 4, p. 1035–1041, 2010.

ZHOU, B.; TIAN, Y.; ZHONG, H. Application of a two-stage agitation speed control strategy to enhance yellow pigments production by *Monascus Anka* Mutant. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1260–1264, 2019.

ZHOU, J. et al. ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 94–101, 2009.

ŽNIDARŠIČ, P.; PAVKO, A. The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 237–252, 2001.

ZOLLINGER, H. **Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments**. 3rd revise ed. [s.l.] Wiley- VCH, Weinheim, 2003.

Material Suplementar

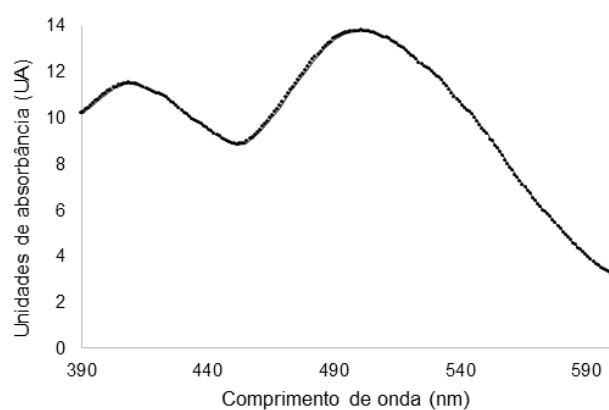


Figura S1. Espectro de absorbância dos colorantes produzidos por *T. amestolkiae* em agitador rotativo utilizando o meio GMS-glicose e 15 discos de micélio.

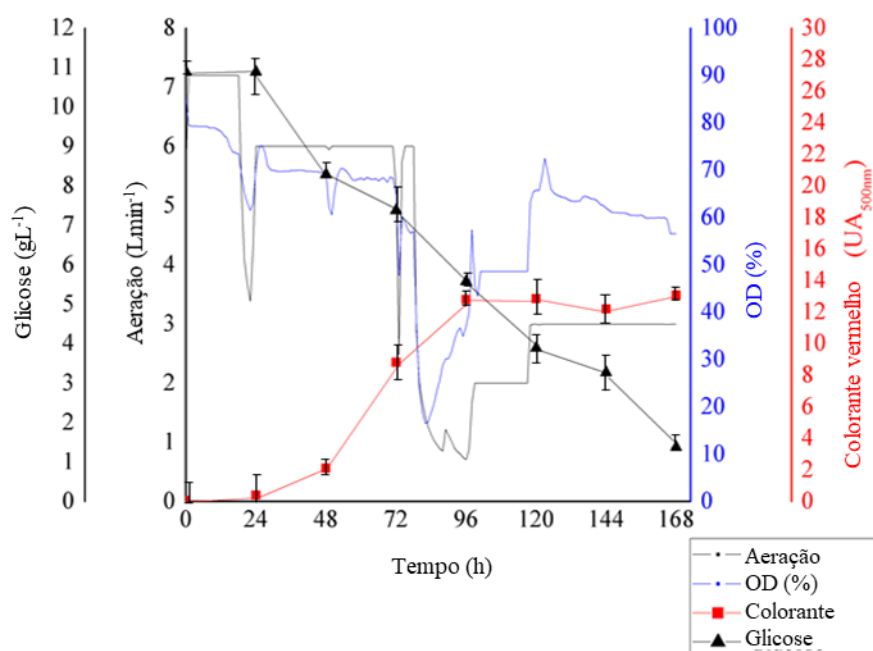


Figura S2. Cultivo em biorreator de tanque agitado empregando as turbinas Rushton em modo de aeração em cascata com nível OD fixado em 100 % de saturação de ar. O experimento foi realizado a 30 °C e uma velocidade de agitação de 100 rpm. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Tabela S1. Valores colorimétricos para todas as condições testadas na produção de colorantes por *T. amestolkiae* em agitador rotativo a 30 °C e 150 rpm de agitação.

Planejamento fatorial 2 ³					
Ensaio	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz
1	86,18	-1,77	4,99	5,29	70,47
2	86,78	-0,96	2,39	2,58	68,12
3	57,28	38,73	48,76	62,27	51,54
4	86,67	-1,23	3,42	3,63	70,22
5	71,03	22,85	27,19	35,52	49,96
6	86,89	-1,14	2,21	2,49	62,71
7	57,18	41,26	40,36	57,72	44,37
8	86,62	-1,18	3,48	3,67	71,27
9	82,47	0,91	15,76	15,79	86,69
Planejamento central composto 2 ²					
Ensaio	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz
1	76,51	14,14	13,79	19,75	44,28
2	72,65	21,33	17,14	27,36	38,78
3	56,72	38,45	36,31	52,88	43,36
4	31,91	59,80	55,01	81,25	42,61
5	83,60	3,13	5,53	6,35	60,49
6	50,28	45,48	55,97	72,12	50,90
7	44,87	57,09	71,79	91,72	51,51
8	40,80	59,67	70,34	92,24	49,69
9	45,31	57,23	71,65	91,70	51,38
Efeito do inóculo					
Nº de discos de micélio	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz
5	35,66	59,88	61,48	85,82	45,76
10	31,62	59,82	54,52	80,94	42,35
15	25,08	57,15	43,24	71,66	37,11
Planejamento Plackett-Burman					
Ensaio	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz
1	29,46	50,16	49,35	70,36	44,53
2	25,86	51,07	44,32	67,61	40,95
3	32,41	53,65	50,36	73,58	43,18
4	37,98	53,68	53,72	75,94	45,02
5	34,41	53,72	54,52	76,53	45,42
6	29,82	56,82	50,75	76,18	41,77
7	29,82	56,82	50,75	76,18	41,77
8	29,88	52,67	50,12	72,70	43,57
9	29,96	52,68	50,24	72,79	43,64
Efeito da concentração de magnésio					
Mg ⁺² (mg/L)	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz
6	25,86	51,07	44,32	67,61	40,95
12	13,04	45,53	22,49	50,78	26,29
24	18,42	51,28	31,75	60,31	31,76

Tabela S2. Cultivo em biorreator empregando as turbinas Rushton para produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* a 30 °C e 100 rpm. Valores obtidos ao final do cultivo (168 h).

Condição	Controle de OD (%)	Biomassa (gL ⁻¹)	Colorante vermelho UA _{500nm}	Consumo de Glicose (% m/m)**	Viscosidade aparente (cP) [§]
Aeração em cascata	100 %	4,33 ± 0,12	13,08 ± 0,07	87,3 ± 0,02	3,15 ± 0,95

* O consumo de glicose foi baseado na concentração de glicose em % (m/m);

[§] Viscosidade aparente do meio antes da inoculação foi semelhante à viscosidade da água ($\mu = 1,23 \pm 0,03$ cP);

As análises foram realizadas em triplicata. O erro representa 95 % do limite de intervalo de confiança.

Tabela S3. Estabilidade do corante vermelho de *T. amestolkiae*, pH inicial de 5,0, em diferentes valores de pH e na presença de sais.

pH	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz	λ _{EM} (nm)	λ _{EX} (nm)	Intensidade	Condutividade (mS/cm)
pH									
1	0,13	0,95	0,22	0,97	13,26	441	258	54600	57,39
						427	322	39800	
						519	482	201600	
3	2,27	16,31	3,92	16,77	13,51	440	258	83320	14,84
						430	316	56160	
						518	478	297680	
5**	7,74	38,47	13,35	40,72	19,14	444	260	95600	8,98
						431	318	59200	
						519	478	308120	
7	9,08	40,21	15,66	43,15	21,27	436	260	145320	10,71
						440	316	69600	
						517	478	292560	
9	7,16	37,24	12,35	39,23	18,34	439	260	133360	11,34
						438	314	65880	
						518	478	392600	
11	11,04	42,38	19,03	46,46	24,18	445	258	186000	18,36
						427	308	104700	
						513	476	1,516800	
13	33,99	55,17	58,60	80,48	46,72	441	258	161320	38,03
						432	308	112480	
						520	482	148080	
Reversibilidade									
1	10,33	41,78	17,81	45,42	23,08	437	262	102280	35,99
						436	322	64560	
						518	476	242680	
3	9,99	41,40	17,22	44,84	22,58	439	262	122640	20,35
						435	318	73440	
						519	480	280640	
7	9,05	40,17	15,60	43,10	21,23	438	262	82240	11,41
						432	314	44380	
						517	480	161260	
9	7,99	38,63	13,77	41,01	19,63	439	260	143680	12,70
						434	312	81360	
						516	480	514320	
11	13,41	45,50	23,12	51,04	26,94	435	262	182800	24,00
						426	310	120000	
						516	480	1,613000	
13	50,47	40,87	86,59	95,75	64,73	442	258	186560	29,25
						432	308	130752	
						525	480	154200	
K ₃ PO ₄									
%(m/m)	L*	a*	b*	Croma	Ângulo de matiz	λ _{EM} (nm)	λ _{EX} (nm)	Intensidade	Condutividade (mS/cm)
15 %	35,76	49,73	55,92	74,83	48,35	432	256	47300	36,77
						430	312	35200	
						518	474	66400	
30 %	34,19	45,14	58,71	74,06	52,45	-	-	-	38,98
						428	316	30740	
						518	474	93460	
MnSO ₄									
15 %	14,29	46,74	24,63	52,83	27,79	434	258	225520	45,11
						431	316	97000	
						519	478	187840	
30 %	39,47	55,17	68,04	87,60	50,96	438	260	192500	46,06
						436	316	89080	
						519	476	55260	

**Controle dos experimentos (meio fermentado, pH = 5,0).

Artigos

Artigos publicados

DE OLIVEIRA, F.; PEDROLI, D. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; SANTOS-EBINUMA, V. C. Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, v. 103, p. 6529-6541, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09972-z>

DE OLIVEIRA, F.; FERREIRA, L. C ; NETO, Á. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; SANTOS-EBINUMA, V. C. . Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, v. 1, p. 107694, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107694>

Artigos submetidos

DE OLIVEIRA, F.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Bioreactor hydrodynamic impact on fungal morphology and bio-based colorant production. Process Biochemistry. Submetido em Outubro de 2020. Status: Under review.

Artigos em redação

DE OLIVEIRA, F.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Enhancement of water-soluble red color stability at high pH.



Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*

Fernanda de Oliveira¹ · Danielle Biscaro Pedrolli¹ · Maria Francisca Simas Teixeira² · Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma¹

Received: 31 January 2019 / Revised: 24 May 2019 / Accepted: 6 June 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The replacement of synthetic colors in food products by natural alternatives has been boosted by consumers willing to pay more for healthier products. However, the success of microbial colorants depends not only on its acceptability on the market but also its production costs. *Talaromyces* species can produce water-soluble red colorants induced by glucose and monosodium glutamate (MSG). In this study, the influence of several conditions was evaluated to produce natural red colorants by submerged culture of *Talaromyces amestolkiae*. Under optimal conditions (g/L: glucose 10, MSG 25, MgSO₄ 0.012, FeSO₄ 0.01, CaCl₂ 0.015; and initial pH of 5.0), a 30-fold increase in the production was achieved, reaching a red colorant production of 13.44 UA_{500nm}. Depending on the initial pH, colorants with different hues and chroma values were obtained. Deep yellow colorants were derived from neutral and basic pH, while deep red colors were derived from acidic pH. The fluorescence spectrum of culture broth obtained before and after complexation with salts presented red colorants with yellow fluorescence spectra. The information generated in this study would be useful for the formulation of industrial media for large-scale cultivation of *T. amestolkiae*, which have the potential to produce *Talaromyces* fermented colorants for use in health foods and pharmaceuticals.

Keywords Red colorants · *Talaromyces amestolkiae* · Monosodium glutamate · Submerged culture · Fluorescence and colorimetric analysis

Introduction

Most industrial products are colorful. Considering food and beverages, color is one of the most important product-intrinsic sensory cues of our expectations of taste and flavor (Vinha et al. 2018). The market for industrial colorants is primarily occupied by synthetic/artificial ones. However, there is a need for suitable coloring agents from natural sources because of

serious safety problems with several artificial synthetic colorants (Lehto et al. 2017). Therefore, natural colorants have gained importance because some of them present pharmacological properties, such as antimicrobial activity against *Escherichia coli* (Kim et al. 2006) and *Staphylococcus aureus* (Zaccarim et al. 2018). The replacement of artificial colorants by their natural counterparts is a major challenge for the food, pharmaceutical, and cosmetics industries, both from a technical perspective and because of ingredient costs (Galaffu et al. 2015).

Currently, more than 50 patents concerning the use of microbial colorants for food have been issued in Japan, USA, France, and Germany. Nowadays, some fermentative food grade colorants are on the market: *Monascus* colorants, astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, Arpink Red (or Natural Red) from *Penicillium oxalicum*, riboflavin from *Ashbya gossypii*, and β -carotene or lycopene from *Blakeslea trispora* (Dufossé 2017). However, new natural colorant producers are of great interest. In this sense, filamentous fungi as colorant producers are gaining ground in industrial production of biotechnological products because of the

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09972-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma
valeria.ebinuma@unesp.br

¹ Department of Bioprocess and Biotechnology, School of Pharmaceutical Sciences, Campus (Araraquara), Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú/ Km 01, Campos Ville - Araraquara/SP, Araraquara, SP 14800-903, Brazil

² Culture Collection DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM 69077-000, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej



Regular article

Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: Mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor



Fernanda de Oliveira^a, Laura Carmona Ferreira^a, Álvaro Baptista Neto^a, Maria Francisca Simas Teixeira^b, Valéria de Carvalho Santos Ebinuma^{a,*}

^a Department of Bioprocess Engineering and Biotechnology, School of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, SP, Brazil
^b Culture Collection DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, 69.077-000 Manaus, AM, Brazil

HIGHLIGHTS

- MSG and environmental pH played an important role in external stresses, affecting cell growth and colorants formation.
- Fungi morphology was correlated to the influence of pH at membrane charge level.
- There were no direct relationships among mycelium accumulation with morphology and colorant production.
- Pellets formation favored suitable oxygenation of the culture broth leading to the best metabolism of the carbon source.

ARTICLE INFO

Keywords:
 Natural colorants
Talaromyces amestolkiae
 Cell morphology
 Bioreactor
 Scaling-up

ABSTRACT

Fungi bioproducts have recently become commercially important to the food and pharmaceutical industry. However, different structural forms exhibited by filamentous fungi throughout their life cycles are often a bottleneck for productivity in many industrial processes. In this work, the relationship among mycelium accumulation, morphology, and colorant production was evaluated. Experiments were performed in an incubator shaker and in a stirred-tank bioreactor. First, a series of nitrogen sources and pure vitamins were investigated as additives to the monosodium glutamate-glucose medium in order to improve *Talaromyces amestolkiae* red colorant production in the incubator shaker. MSG and pH played an important role in generating stress, which affected cell growth and colorants production. The colorant synthesis seems to be triggered under metabolic stress. Next, the effects of starter culture composition (MSG-glucose and nitrogen complex starter media) and airflow (2.0 and 8.0 L min⁻¹) were investigated in the bioreactor. After 120 h of cultivation in the bioreactor, a maximum red colorant production of 9.33 UA_{500nm}, 72.38 % glucose consumption, and 4.53 g L⁻¹ biomass concentration were achieved under complex nitrogen as starter medium at 8 L min⁻¹. Growth remained at moderate level, probably affected by the synergistic effect of MSG and pH as stress factors. Moreover, pellets formation favored suitable oxygenation of the culture broth leading to the best consumption of the carbon source.

1. Introduction

Filamentous fungi are able to produce an impressive array of secondary metabolites in response to stress [1]. Many of these molecules may become multi-billion-dollar industrial products, with their value expected to increase due to a shift from petroleum to a bio-based world-wide economy [2–4]. Natural colorants are secondary metabolites that have gradually become a scientific research hotspot in recent years [5,6]. According to the recent Global Info Research report [7], the

worldwide market for natural colorants will register a 5.4 % Compound Annual Growth Rate (CAGR) in terms of revenue, reaching US\$ 1620 million by 2023. Throughout the years, *Monascus* colorants have found wide applications mainly in Oriental/Asian countries, in more than 20 kinds of food products [8,9]. However, *Monascus* species co-produce a mycotoxin named citrinin, which is considered a great concern in foods, making the toxin detection decisive for consumer safety [10,11].

Novel producers of *Monascus*-like natural colorants have gained scientific and industrial interest due to their ability to produce a wide

* Corresponding Author at: Universidade Estadual Paulista (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Campus (Araraquara), Department of Engineering Bioprocess and Biotechnology, Rodovia Araraquara-Jaú/ Km 01, Campos Ville, 14800-903, Araraquara, SP, Brazil.
 E-mail address: valeria.ebinuma@unesp.br (V. de Carvalho Santos Ebinuma).

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107694>

Received 17 April 2020; Received in revised form 18 June 2020; Accepted 20 June 2020

Available online 22 June 2020

1369-703X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.