

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCELO LUIS KUHN MARCHIORO**

**BIOPROSPECÇÃO DO FUNGO *Lasiodiplodia theobromae* MMPI  
PARA PRODUÇÃO INTEGRADA DE BIOMASSA MICELIAL E  $\beta$ -  
GLUCANA**

**PATO BRANCO**

**2022**

MARCELO LUIS KUHN MARCHIORO

**BIOPROSPECÇÃO DO FUNGO *Lasiodiplodia theobromae* MMPI  
PARA PRODUÇÃO INTEGRADA DE BIOMASSA MICELIAL E  $\beta$ -  
GLUCANA**

**Bioprospection of the fungus *Lasiodiplodia theobromae* MMPI for integrated  
production of mycelial biomass and  $\beta$ -glucan**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos”

Professor Orientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha.

**Pato Branco**

**2022**



[4.0 internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho licenciado para fins não comerciais, desde que atribuam ao autor o devido crédito. Os usuários não têm que licenciar os trabalhos derivados sob os mesmos termos estabelecidos pelo autor do trabalho original.



**Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Pato Branco**



MARCELO LUIS KUHN MARCHIORO

**BIOPROSPECÇÃO DO FUNGO LASIODIPLODIA THEOBROMAE MMPI PARA PRODUÇÃO INTEGRADA DE BIOMASSA MICELIAL E -GLUCANA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 25 de Fevereiro de 2022

Prof Mario Antonio Alves Da Cunha, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Andreia Anschau, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Marina Leite Mitterer Daltoe, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Vidiany Aparecida Queiroz Santos, Doutorado - Faculdade de Pato Branco (Fadep)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/02/2022.

## RESUMO

A produção de biomassa micelial e  $\beta$ -D-glucana extracelular (lasiodiplona) pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi estudada como uma plataforma biotecnológica integrada. Meios de cultura a base de sacarose comercial e melaço de soja foram avaliados para o cultivo do fungo. Planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta foram empregados para definir as condições que maximizam a produção micelial e analisar a coprodução da lasiodiplodana, uma (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana com propriedades biológicas de relevância biomédica. Delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> (DCCR 2<sup>3</sup>) foi usado para avaliar a influência da concentração de substrato (açúcares totais), concentração de extrato de farelo de arroz (fonte de nitrogênio) e velocidade de agitação sobre o crescimento micelial e produção de lasiodiplodana. As biomassas produzidas foram caracterizadas quanto a composição proximal, perfil de aminoácidos e lipídico, potencial antioxidante, conteúdo de fenólicos totais e compostos bioativos, perfil termogravimétrico e características morfológicas. A composição do meio de cultivo foi determinante na definição das quantidades de biomassa micelial e lasiodiplodana produzidas, bem como sobre a qualidade e composição nutricional das biomassas. As condições que promoveram maior crescimento micelial foram 64,43 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais, 8,81% de extrato de farelo de arroz e 152,83 rpm de agitação em meio base de melaço de soja. Tal condição de cultivo promove uma produção de 12,44 g L<sup>-1</sup> de lasiodiplodana. Meio a base de sacarose contribuiu para maior produção de lasiodiplodana. As biomassas produzidas em ambos os meios apresentaram apreciáveis conteúdos de proteínas (16,27 g 100 g<sup>-1</sup> e 19,88 g 100 g<sup>-1</sup>). A biomassa oriunda do meio formulado com melaço de soja apresentou todos os aminoácidos essenciais e em concentrações superiores a biomassa produzida em meio com sacarose. O melaço de soja também promoveu a produção de biomassa rica em lipídios (43,76 g 100 g<sup>-1</sup>) em especial os ácidos graxos insaturados (32,67 g 100 g<sup>-1</sup>) com destaque para o conteúdo de poli-insaturados (27,42 g 100 g<sup>-1</sup>) como os ácidos gama-linoleico (24,38 g 100 g<sup>-1</sup>) e alfa-linolênico (2,99 g 100 g<sup>-1</sup>). Os extratos obtidos das biomassas embora continham baixos conteúdos de fenólicos totais apresentam considerável potencial antioxidante contra os radicais ABTS, DPPH, hidroxila e poder redutor dos íons férrico e molibdênio VI. Ácido gálico e catequina foram os compostos majoritários entre os biocompostos identificados nos extratos. Ácido cinâmico foi identificado em ambos os extratos e ácido *p*-cumárico no extrato de biomassa de melaço. As análises termogravimétricas mostraram que ambas as biomassas apresentam estabilidade térmica considerando condições industriais comumente usadas em indústrias de alimentos e de rações. Os resultados obtidos indicam a potencialidade técnica de uma produção integrada de biomassa micelial e lasiodiplodana a partir de ambos os meios de cultivo, os quais são de baixo custo. As biomassas miceliais produzidas em meio a base de sacarose e melaço de soja apresentam potencial como ingrediente especialmente para ração animal, em função de sua composição em proteínas, lipídios, fibra alimentar e conteúdo mineral. Outro aspecto importante a ser destacado é que o elevado conteúdo de lipídios encontrado na biomassa produzida em melaço de soja indica pela primeira vez o fungo *L. theobromae* MMPI como um microrganismo oleaginoso, com perspectivas para exploração de biocombustíveis e ácidos graxos.

**Palavras-chave:** Fungo oleaginoso. Micoproteína. Lasiodiplodana. *Single cell protein*.

## ABSTRACT

The production of mycelial biomass and exocellular  $\beta$ -D-glucan (lasiodiplon) by the fungus *Lasioidiplodia theobromae* MMPI was studied as an integrated biotechnological platform. Sucrose-based culture media and soybean molasses were evaluated for the fungus cultivation. Experimental design and response surface methodology were employed to define conditions that maximize mycelial production and to analyze the co-production of lasiodiplodan, a (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan with biological properties of biomedical relevance. Central composite rotational design  $2^3$  (DCCR  $2^3$ ) was used to evaluate the influence of substrate concentration (total sugars), rice bran extract concentration (nitrogen source) and agitation speed on mycelial growth and lasiodiplodan production. The biomasses produced were characterized in terms of proximal composition, amino acid and lipid profile, antioxidant potential, content of total phenolics and bioactive compounds, thermogravimetric profile and morphological characteristics. The composition of the culture medium was decisive in defining the quantities of mycelial biomass and lasiodiplodan produced, as well as the quality and nutritional composition of the biomasses. The conditions that promoted the greatest mycelial growth were 64.43 gL<sup>-1</sup> of total sugars, 8.81 of rice bran extract and 152.8 rpm of agitation in a medium based on soybean molasses. Such culture condition promotes a production of 12.44 gL<sup>-1</sup> of lasiodiplodan. Sucrose-based medium contributed to higher production of lasiodiplodan. The biomasses produced in both media showed appreciable protein content (16.27 g100g<sup>-1</sup> and 19.88 g100g<sup>-1</sup>). The biomass from the medium formulated with soy molasses presented all essential amino acids and in concentrations higher than the biomass produced in medium with sucrose. Soybean molasses also promoted the production of lipid-rich biomass (43.76 g 100 g<sup>-1</sup>), especially unsaturated fatty acids (32.67 g 100 g<sup>-1</sup>), with emphasis on the polyunsaturated content (27, 42 g 100g<sup>-1</sup>) such as gamma-linoleic acid (24.38 g 100g<sup>-1</sup>) and alpha-linolenic acid (2.99 g 100g<sup>-1</sup>). The extracts obtained from both biomasses, although containing low contents of total phenolics, present considerable antioxidant potential against ABTS, DPPH, hydroxyl radicals and reducing power of ferric and molybdenum VI ions. Gallic acid and catechin were the major compounds among the biocompounds identified in the biomass extracts. Cinnamic acid was identified in both extracts and *p*-coumaric acid in the molasses biomass extract. Thermogravimetric analyzes showed that both biomasses present thermal stability considering industrial conditions commonly used in the food and feed industries. The results obtained indicate the technical potential of an integrated production of mycelial biomass and lasiodiplodan from both culture media, which are low cost. The mycelial biomasses produced in sucrose and soy molasses medium have potential as an ingredient especially for animal feed due to their composition in proteins, lipids, dietary fiber and mineral content. Another important aspect to be highlighted is that the high lipid content found in the biomass produced in soybean molasses indicates for the first time the fungus *L. theobromae* MMPI as an oleaginous microorganism, with prospects for exploration of biofuels and fatty acids.

**Keywords:** Lasiodiplodan. Mycoprotein. Oleaginous fungus. Single cell protein

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química e espacial das proteínas .....	15
Figura 2 – Superfície de resposta para a produção ( $P_x$ ) e rendimento em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) nos meios formulados com melão de soja (a e c) e sacarose (b e d) .....	36
Figura 3 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produção ( $P_x$ ) e rendimento em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) nos meios formulados com melão de soja (a e c) e sacarose (b e d) .....	37
Figura 4 - Perfil fermentativo do fungo <i>L. theobromae</i> MMPI nos meios a base de (a) melão de soja e (b) sacarose .....	42
Figura 5 - Cromatogramas CLAE-PAD do extrato das biomassas obtidas nos meios A) MMS e B) MSAC e compostos identificados .....	52
Figura 6 - Micrografias das amostras de biomassa (BIO MMS e BIO MSAC) e lasiodiplodana (LAS MMS e LAS MSAC) .....	55
Figura 7 - Perfil térmico das biomassas (a e b) e da lasiodiplodana (c e d) produzidas em meio MMS e MSAC .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de aminoácidos recomendado por especialistas segundo WHO/FAO/UNU (2007) (exigência em g / 100 g de proteína).....	17
Tabela 2 - Planejamento experimental – DCCR 2 <sup>3</sup> .....	24
Tabela 3 - Produção e rendimento em biomassa micelial em 96 horas de cultivo nos meios MMS e MSAC .....	33
Tabela 4 - Produção (P <sub>F</sub> ) e rendimento (Y <sub>P/S</sub> ) em lasiodiplodana em 96 horas de cultivo nos meios MMS e MSAC .....	40
Tabela 5 - Valores críticos e experimentais para o rendimento e produção de biomassa celular em meio a base de melão de soja e sacarose em 96 h de cultivo .....	42
Tabela 6 - Parâmetros fermentativos em 96 h de cultivo com <i>L. theobromae</i> MMPI em meios a base de melão de soja e sacarose.....	43
Tabela 7 - Composição proximal e perfil de aminoácidos e ácidos graxos das biomassas miceliais de <i>L. theobromae</i> MMPI cultivadas em meio MMS e MSAC ....	49
Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos dos compostos fenólicos detectados por CLAE-PAD .....	52
Tabela 9 - Potencial antioxidante dos extratos obtidos das biomassas de <i>L. theobromae</i> MMPI.....	54
Tabela 10 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de biomassa celular em meio MMS.....	68
Tabela 11 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de biomassa celular em meio MSAC.....	69
Tabela 12 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em biomassa celular em meio MMS.....	70
Tabela 13 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em biomassa celular em meio MSAC.....	71
Tabela 14 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de lasiodiplodana em meio MMS .....	72
Tabela 15 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em lasiodiplodana em meio MMS .....	73
Tabela 16 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de lasiodiplodana em meio MSAC .....	74



Tabela 17 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em lasiodiplodana em meio MSAC .....	75
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Fator de conversão de substrato em biomassa .....	25
Equação 2 – Fator de conversão de substrato em EPS.....	25
Equação 3 – Produtividade volumétrica em biomassa celular .....	26
Equação 4 – Produtividade volumétrica em EPS .....	26
Equação 5 - Percentual de consumo de substrato.....	26
Equação 6 - Taxa total de consumo de substrato .....	26
Equação 7 - Rendimento específico.....	26
Equação 8 - Proteína total.....	28
Equação 9 - % de remoção de OH.....	31
Equação 10 - Modelo matemático para o crescimento micelial em meio MMS .....	35
Equação 11 - Modelo matemático para o crescimento micelial em meio MSAC.....	35
Equação 12 - Modelo matemático para o rendimento micelial em meio MMS .....	35
Equação 12 - Modelo matemático para o rendimento micelial em meio MSAC .....	35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
3.1	PROTEÍNAS: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, NUTRICIONAIS E DE PRODUÇÃO 15	
3.2	SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA .....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1	PRODUÇÃO DA BIOMASSA MICELIAL .....	22
4.1.1	Microrganismo e Matéria-Prima.....	22
4.1.1.1	Manutenção da cepa fúngica e preparo de inóculo .....	22
4.1.1.2	Clarificação do melaço de soja .....	22
4.1.1.3	Preparo do extrato de farelo arroz .....	22
4.1.2	Cultivo Submerso para Produção de Biomassa Micelial e Coprodução de Lasiodiplodana .....	23
4.1.3	Métodos Analíticos .....	24
4.1.3.1	Determinação do teor de biomassa fúngica.....	24
4.1.3.2	Determinação de produção de Lasiodiplodana.....	24
4.1.3.3	Determinação do consumo do substrato .....	25
4.1.3.4	Determinação dos parâmetros fermentativos .....	25
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS .....	26
4.2.1	Composição Proximal.....	26
4.2.1.1	Umidade.....	27
4.2.1.2	Resíduo mineral fixo .....	27
4.2.1.3	Lipídeos .....	27
4.2.1.4	Proteínas.....	27
4.2.1.5	Fibra bruta.....	28
4.2.1.6	Teor de fibra alimentar.....	28
4.2.2	Perfil de Aminoácidos e Composição de Lipídios .....	28

4.2.3	Avaliação de Fenólicos Totais, Atividade Antioxidante e Compostos Bioativos	29
4.2.3.1	Extração de compostos bioativos .....	29
4.2.3.2	Conteúdo fenólicos totais .....	29
4.2.3.3	Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH .....	29
4.2.3.4	Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS .....	30
4.2.3.5	Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP .....	30
4.2.3.6	Sequestro do radical hidroxila .....	31
4.2.3.7	Capacidade antioxidante total (CAT) .....	31
4.2.3.8	Análise de compostos bioativos por HPLC-PDA.....	31
4.2.4	Microscopia Eletrônica De Varredura – MEV .....	32
4.2.5	Análise Termogravimétrica .....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
5.1	CO-PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL E $\beta$ -GLUCANA PELO FUNGO <i>L. theobromae</i> MMPI.....	33
5.2	VALIDAÇÃO DOS MODELOS PREDITIVOS E ESTUDO CINÉTICO DO CULTIVO DE <i>L. theobromae</i> MMPI EM MEIOS A BASE DE MELAÇO DE SOJA E SACAROSE .....	41
5.3	COMPOSIÇÃO PROXIMAL E PERFIL AMINOACÍDICO E ÁCIDOS GRAXOS DAS BIOMASSAS OBTIDAS DE <i>L. theobromae</i> MMPI.....	44
5.4	FENÓLICOS TOTAIS E PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE-PDA .....	50
5.5	POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DAS BIOMASSA DE <i>L. theobromae</i> MMPI.....	53
5.6	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS BIOMASSAS MICELIAIS E DA LASIODIPLODANA .....	55
5.7	PERFIL TÉRMICO DAS AMOSTRAS DE BIOMASSA E LASIODIPLODANA .....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
	<b>APÊNDICE A – ANOVA PARA PRODUÇÃO EM BIOMASSA MICELIAL DE <i>L. THEOBROMAE</i> MMPI EM MEIO MMS .....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE B – ANOVA PARA PRODUÇÃO EM BIOMASSA MICELIAL DE <i>L. THEOBROMAE</i> MMPI EM MEIO MSAC .....</b>	<b>69</b>

<b>APÊNDICE C – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM BIOMASSA MICELIAL DE <i>L. THEOBROMAE</i> MMPI EM MEIO MMS .....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE D – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM BIOMASSA MICELIAL DE <i>L. THEOBROMAE</i> MMPI EM MEIO MSAC .....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE E – ANOVA PARA PRODUÇÃO DE LASIODIPLDANA EM MEIO MMS72</b>	
<b>APÊNDICE F – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM LASIODIPLDANA EM MEIO MMS73</b>	
<b>APÊNDICE G – ANOVA PARA PRODUÇÃO DE LASIODIPLDANA EM MEIO MSAC</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE H – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM LASIODIPLDANA EM MEIO MSAC</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos em função do crescimento mundial da população, associado a demanda da produção de rações para atender as atividades de pecuária e mercado pet, além de questões ambientais como o esgotamento de recursos naturais, criam a necessidade de pesquisas voltadas a busca de novas fontes alimentícias e proteicas alternativas.

De acordo com a organização mundial das nações unidas (ONU), a população mundial em 2050 ultrapassará a 9,5 bilhões de indivíduos, o que exigirá maior oferta de alimentos, incluindo fontes de proteínas (UNITED NATIONS, 2019).

A produção mundial de carnes, principalmente de aves e de suínos tem aumentado nas últimas décadas, em função tanto da expansão territorial da produção como do aumento de produtividade. Segundo o departamento de agricultura dos Estados Unidos, os maiores produtores globais de carne são os EUA, o Brasil, a União Europeia e a China. O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de carnes bovina e de frango e quarta posição em relação a carne suína (VECCHI, 2018).

Em muitos países a expansão da área para a produção de alimentos é um fator limitante para o aumento da produção agrícola, estando tal expansão atrelada a destruição de florestas nativas. Outros aspectos que tem sido debatidos com relação a produção de proteína animal, incluem a liberação de gases de efeito estufa pelos ruminantes, alto consumo de água e a demanda por fontes de proteínas alternativas dos mercados vegetariano e vegano.

Nos últimos anos diversos trabalhos reportados na literatura científica descrevem a obtenção e o uso de proteínas de fontes alternativas, incluindo proteínas de origem fúngica (micoproteína), bacteriana, oriunda de algas, vegetal e de insetos (grilos, gafanhotos e pupa de bicho-da-seda).

Proteína fúngica ou micoproteína são termos que se referem a proteínas obtidas em cultivos com fungos unicelulares (leveduras) ou filamentosos. O conceito de micoproteína envolve outros componentes nutricionais além das proteínas, aminoácidos, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais. São consideradas fontes alternativas de proteína, que podem ser utilizadas para alimentação humana ou nutrição animal (STOFFEL *et al.*, 2019).

Buscando contribuir para a obtenção e estudo de fontes de proteína alternativa e ingredientes para produção de ração animal, o presente projeto avaliou a produção de biomassa micelial pelo fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI cultivado em sistema submerso em meios a base de sacarose comercial e melão de soja. O trabalho também avaliou a produção associada da lasiodiplodana, uma (1→6)-β-D-glucana extracelular que apresenta diversas propriedades biológicas e tecnológicas e é biosintetizada concomitantemente com o crescimento micelial e . Neste sentido, o projeto buscou contribuir para o desenvolvimento de uma plataforma de produção biotecnológica integrada, associando a produção de biomassa e uma biomacromolécula de elevado valor comercial, agregando assim maior valor ao processo.

A biomassa micelial produzida foi avaliada quanto a suas propriedades nutricionais, incluindo composição proximal, perfil de aminoácidos e lipídios, conteúdo de fenólicos totais, compostos bioativos, potencial antioxidante, microscopia eletrônica de varredura, perfil termogravimétrico e perfil espectrométrico na região do infravermelho. Meios sintéticos a base de sacarose (açúcar comercial) e de melão de soja foram avaliados como substratos de baixo custo para produção de biomassa micelial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar biomassa micelial do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI para avaliação de seu potencial como fonte alimentícia e de proteína alternativa.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir as melhores condições de produção de biomassa micelial do fungo em meios a base de sacarose e melaço de soja em cultivos submersos usando metodologia de planejamento experimental;
- Otimizar os parâmetros de cultivo concentração de substrato (açúcares totais), concentração de extrato de farelo de arroz e agitação;
- Determinar a composição proximal da biomassa micelial (proteína bruta, lipídios totais, fibra alimentar, umidade, resíduo mineral fixo e carboidratos totais);
- Determinar o perfil de aminoácidos e lipídico das biomassas obtidas;
- Avaliar o potencial antioxidante, conteúdo de fenólicos totais e compostos bioativos nas biomassas miceliais.
- Caracterizar a biomassa Microscopia eletrônica de varredura
- Avaliar o perfil termogravimétrico da biomassa micelial produzida nas condições otimizadas.

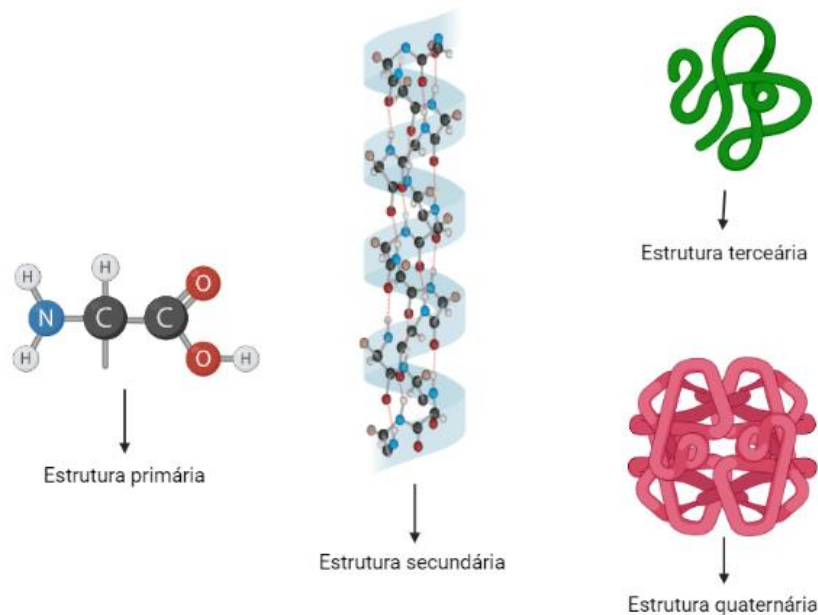


### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PROTEÍNAS: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, NUTRICIONAIS E DE PRODUÇÃO

Proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos. Tais moléculas desempenham uma variedade de funções dinâmicas e estruturais no organismo, como catálise de transformações químicas, transporte e controle metabólico, defesa do organismo, funcionam como matrizes estruturais para os ossos e tecido conjuntivo, participam dos mecanismos de contração muscular e coagulação, além de atuarem regulando a transcrição e tradução de genes. São definidas por sua estrutura secundária, terciária e quaternária (Figura 1) e diferem entre si fundamentalmente em sua sequência de aminoácidos (DEVLIN, 2011; NELSON; COX, 2018).

Figura 1 - Estrutura química e espacial das proteínas



Fonte: Autoria própria.

Todos os tipos de proteínas são polímeros constituídos por apenas 21 aminoácidos, sendo estes as unidades básicas que compõe as proteínas. Cerca de

200 tipos de aminoácidos podem ser encontrados na natureza, mas apenas 21 são metabolizados pelo corpo humano. Deste grupo, 12 são sintetizados pelo próprio organismo sendo chamados de não essenciais, e 9 não são sintetizados pelo corpo humano, sendo denominados essenciais (indispensáveis). Os aminoácidos essenciais necessitam ser ingeridos como parte da dieta (MITSUHASHI, 2014; NELSON; COX, 2018), visto que não são produzidos pelo organismo.

Dietas ricas em proteína têm mostrado benefícios para a redução de peso, controle de fatores de risco cardiometabólicos, atenuação de perda de massa livre de gordura (massa magra), redução da circunferência da cintura e melhora dos marcadores de glicose no sangue. Entretanto, dietas ricas em proteína animal, em particular a base de carne, têm sido associadas a riscos de mortalidade, ao aumento de problemas cardiovasculares e o aumento de diferentes tipos de câncer, embora não havendo comprovação científica (SOKOLOWSKI *et al.*, 2019).

A qualidade das proteínas está baseada na composição de seus aminoácidos (particularmente no conteúdo relativo de aminoácidos essenciais) e na digestibilidade. Portanto, proteínas de alta qualidade são aquelas que são facilmente digeridas e contêm os aminoácidos essenciais em quantidades que correspondem às necessidades humanas (FERREIRA *et al.*, 2005). A recomendação de ingestão diária de proteínas para uma pessoa adulta é de 0,8 a 1 g por quilograma de peso corporal. Importante destacar que uma dieta deve possuir um conteúdo de proteína que pelo menos compense as perdas corporais de nitrogênio e promova a manutenção da massa proteica, fornecendo base estrutural e funcional para o crescimento e manutenção do organismo (BERRYMAN *et al.*, 2018; BOYE; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2012).

Nem toda proteína apresenta qualidade nutricional adequada para suprir as necessidades do organismo. Proteínas vegetais, por exemplo, podem ser deficientes em alguns aminoácidos essenciais. Os cereais geralmente contêm baixos níveis de Lisina, enquanto as leguminosas têm uma deficiência em aminoácidos sulfurados (Met e Cys) (SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020). De fato, a proteína de origem animal é a mais consumida no mundo, e neste sentido o aumento da população propiciará a elevação da demanda de proteína animal.

A Tabela 1 – Conteúdo de aminoácidos recomendado por especialistas segundo WHO/FAO/UNU (2007) (exigência em g / 100 g de proteína)Tabela 1

mostra a recomendação de especialistas em relação ao conteúdo de aminoácidos essenciais necessários em função da faixa etária (SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020).

Tabela 1 – Conteúdo de aminoácidos recomendado por especialistas segundo WHO/FAO/UNU (2007) (exigência em g / 100 g de proteína)

Aminoácidos essenciais	Idade (anos)					
	0,5	1-2	3-10	11-14	15-18	Adultos>18
Histidina (His)	2	1,8	1,6	1,6	1,6	1,5
Isoleucina (Ile)	3,2	3,1	3	3	3	3
Leucina (Leu)	6,6	6,3	6,1	6,1	6	5,9
Lisina (Lis)	5,7	5,2	4,8	4,8	4,7	4,5
Treonina (Thr)	3,1	2,7	2,5	2,5	2,4	2,3
Triptofano (Trp)	0,85	0,7	0,66	0,66	0,63	0,6
Valina (Val)	4,3	4,1	4	4	4	3,9
Aminoácidos totais de enxofre (Met + Cys)	2,7	2,5	2,3	2,3	2,3	2,2
Aminoácidos aromáticos totais (Phe + Tyr)	5,2	4,6	4,1	4,1	4	3,8

Fonte: SÁ; MORENO; CARCIOFI (2020).

Neste contexto, nos últimos anos têm havido um salto significativo no consumo deste tipo de proteína, influenciado principalmente pelo crescimento econômico, mudanças na indústria alimentícia e urbanização. Entretanto, em função de questões ambientais, saúde e bem-estar dos animais, a produção da proteína animal vem cada vez mais sendo confrontada com críticas, como por exemplo os impactos causados pelo aumento da produção de carne bovina e leite, que incluem emissões de gases de efeito estufa e maior mobilização reativa de nitrogênio quando comparado com alternativas nutricionalmente equivalentes (AKANDE *et al.*, 2020).

Atualmente a agricultura (excluindo tabaco, borracha e fibra) representa 43% da área terrestre não desértica e livre de gelo e 70% do uso de água doce. Além disso, a agricultura, a silvicultura e outros usos da terra são responsáveis por aproximadamente um quarto das emissões antropogênicas de gases de efeito

estufa. A produção de proteína animal é responsável pela maior parte do uso destes recursos, embora o seu consumo global represente aproximadamente um terço de toda proteína consumida. Consequentemente, há uma necessidade de novas abordagens para a produção de proteínas que sejam ambientalmente sustentáveis, menos dependentes da terra e da água, e com capacidade de adaptação climática (SILLMAN *et al.*, 2019).

Recentemente, com as discussões intensificadas sobre o impacto climático e a escassez dos recursos para produção de alimentos de origem animal, alguns pesquisadores têm mudado o foco de interesse, voltando-se para a obtenção de novas alternativas com relação a produção de proteínas (ASCHEMANN-WITZEL; PESCHEL, 2019).

Há uma demanda crescente por fontes alternativas e sustentáveis de proteínas, como vegetais, insetos e microrganismos, que possam atender às necessidades nutricionais e sensoriais de satisfação dos consumidores (FASOLIN *et al.*, 2019)

Embora microrganismos sejam utilizados há séculos pelo homem na produção de alimentos e rações para animais, a tecnologia e a produção em larga escala de proteínas microbianas (Single-Cell Proteins – SCP) como alimento foi desenvolvida nos últimos 100 anos, particularmente após a Primeira Guerra mundial. Considerando a grande variedade de microrganismos existentes, estudos visando a condição ideal para a produção de proteína microbiana tem sido conduzidos (REIHANI; KHOSRAVI-DARANI, 2019).

As micoproteínas (proteínas de origem fúngica) podem ser utilizadas como substitutas parciais ou até mesmo totais de alimentos proteicos de origem animal, como as carnes. São fontes saudáveis de aminoácidos essenciais, vitaminas, carboidratos e carotenos. Outro aspecto de grande relevância é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo em sua produção, aliado a questões ambientais e possibilidade de produção controlada independente de clima (HASHEMPOUR-BALTORK *et al.*, 2020).

Finnigan; Needham e Abbott (2017) na revisão bibliográfica intitulada “Mycoprotein: a healthy new protein with a low environmental impact”, descrevem um histórico sobre o surgimento dos estudos sobre a produção de micoproteínas como uma necessidade de atender as demandas mundiais por fontes proteicas. O trabalho aborda ainda aspectos nutricionais das micoproteínas, destacando o elevado

conteúdo de proteínas (45 g/100 g) extraídas do micélio do ascomiceto *Fusarium venenatum*, as quais apresentam propriedades sensoriais similares a carne. No mesmo trabalho é destacado a atual produção industrial da micoproteína oriunda do respectivo fungo e produzida pela companhia Quorn™, cuja sede está localizada na cidade de Stokesley (New Yorkshire, Inglaterra).

De acordo com esses autores esta micoproteína teve a comercialização iniciada no Reino Unido em janeiro de 1985 e em outros países europeus a partir de 1991. Atualmente a companhia tem licença para comercializar os produtos a base desta micoproteína em todos os países da União Europeia e também possui aprovações na Suíça, Noruega, Taiwan, Canadá, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia. Nos Estados Unidos, a companhia Marlow Foods entrou com uma petição de reconhecimento dos produtos contendo essa micoproteína como GRAS (Generally Recognized As Safe, Geralmente Reconhecido Como Seguro) no FDA (Food and Drugs Administration) em 2001. A companhia Quorn™ entrou no mercado dos Estados Unidos em 2002 e dispõe de inúmeros produtos alimentícios contendo micoproteína atendendo tanto o mercado convencional quanto os mercados vegano e vegetariano.

A micoproteína comercializada pela Quorn™ apresenta um escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade de proteínas (PDCAAS) semelhante a proteína do leite, com valor próximo a 1,0. Seu conteúdo de fibra não tem efeito adverso na absorção de minerais e é bem tolerada como alimento. Apenas uma pequena proporção da população pode exibir intolerância à esta micoproteína. Entretanto, tais níveis de intolerância são inferiores aos verificados em alimentos como soja e ovo (HUNTER, 2014).

### 3.2 SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA

Estudos reportados na literatura científica mostram a produção de biomassa proteica (SCP, proteína de célula única) a partir de fungos filamentosos, empregando tanto processos de fermentação submersa como fermentação semissólida e cultivo em superfície. Desses sistemas de fermentação, o sistema submerso pode levar a maiores rendimentos (HASHEMPOUR-BALTORK *et al.*, 2020; SUMAN *et al.*, 2015).

Diferentes substratos de baixo custo são utilizados como fontes de carbono na produção de proteína microbiana, incluindo resíduos, que estão disponíveis em grandes quantidades. Além disso, o processo de produção de proteína microbiana pode ser projetado como um sistema fechado altamente independente de mudanças sazonais, possibilitando o uso eficiente de nutrientes sem escoamento para o ambiente circundante, e o sistema não requer herbicidas ou pesticidas (SILLMAN *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, matérias-primas e subprodutos de origem agroindustrial têm sido propostos como alternativas de fontes de carboidratos de baixo custo para a produção de metabólitos microbianos, com o objetivo de minimizar também os problemas causados pela sua disposição. Durante o processamento de produtos agrícolas, resíduos e subprodutos agroindustriais são gerados, incluindo diversos tipos de palhas, caules, folhas, cascas, legumes, bagaços e grãos, produzidos no beneficiamento de várias culturas do agronegócio (PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015).

Ibarruri e Hernández (2019) estudaram o soro de queijo e melaço de laranja para a produção de biomassa fúngica por fermentação submersa utilizando diferentes cepas do fungo filamentoso *Rhizopus* sp.. Os autores destacaram o melaço de laranja como um promissor substrato para a produção de proteína microbiana, contribuindo para elevados rendimentos em proteína, associado à alta redução de DQO, sem adição de nitrogênio e microsuplementação de nutrientes.

Água residual oriunda do beneficiamento do amido de trigo foi tratada pelos fungos filamentosos comestíveis *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus oryzae* para obtenção de biomassa rica em proteína para uso em alimentação animal, entre outros fins (SOUZA FILHO; ZAMANI; TAHERZADEH, 2019).

Karimi *et al.* (2019) avaliaram a vinhaça oriunda da produção de etanol para produção de biomassa microbiana por ascomicetos e zigomicetos (*Aspergillus oryzae*, *Neurospora intermedia*, *Rizhopus oryzae*, *Monascus purpureus* e *Fusarium venenatum*). Elevados teores de proteínas (44,7%, 57,6% e 50,9% m/m) e gordura (7,0%, 3,5% e 5,5% m/m) foram obtidos nas biomassas miceliais de *A. oryzae*, *N. intermedia* e *R. oryzae*, respectivamente. Outro fator importante destacado pelos autores foi o conteúdo e perfil aminoacídico compatíveis com os da farinha de peixe.

Bagaço de malte e bagaço de uva foram estudados como matérias-primas para a produção de micoproteínas pelos basidiomicetos *Agaricus blazei*, *Auricularia*

*fuscosuccinea* e *Pleurotus albidus* em fermentação no estado sólido. Após colonização micelial dos bagaços esses foram secos e originaram farinhas proteicas, e segundo os autores essa é uma estratégia promissora para o enriquecimento nutricional e a produção de compostos bioativos com potencial para uso em alimentos funcionais (STOFFEL *et al.*, 2019).

Outro material oriundo do processamento agroindustrial que tem sido recentemente estudado como matéria-prima para a obtenção de produtos biotecnológicos é o melaço de soja. Esta biomassa é um coproduto oriundo da produção de concentrado proteico de soja, obtida na etapa de lavagem do farelo desengordurado com solução hidroalcoólica (etanol 60% v/v). O melaço de soja é rico em carboidratos, encerrando em sua composição, sacarose ( $\approx 28,4\%$ ), estaquiose ( $\approx 18,6\%$ ), rafinose ( $\approx 9,68$ ), e menores proporções de glicose, galactose e frutose (CALDEIRÃO *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2008). Além da alta concentração de açúcares, o melaço de soja contém nitrogênio orgânico e outros macros e micronutrientes, o que favorece sua utilização como substrato para o crescimento microbiano e síntese de produtos biológicos (CHENG *et al.*, 2017).

Devido à grande quantidade de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) presentes, as aplicações do melaço de soja ainda são limitadas, devido a difícil digestão destes açúcares por animais não ruminantes, e pela maioria dos microrganismos industriais, incluindo clostrídios, leveduras e bactérias lácticas, a menos que esses açúcares sejam pré-hidrolisados na forma de monossacarídeos (YANG *et al.*, 2018).

Morais *et al.* (2016), relata em seu trabalho a utilização do melaço de soja como substrato para a produção de lipase por meio de fermentação submersa, utilizando as leveduras *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, o qual obteve resultados satisfatórios. Utilizando o mesmo tipo de fermentação, YANG *et al.* (2018) demonstrou a viabilidade da produção de ácido propiônico pela bactéria *Propionibacterium acidipropionici* e o melaço de soja como fonte de carbono.

Cheng *et al.* (2017) mostrou que a levedura *Aureobasidium pullulans* é capaz de consumir os oligossacarídeos presentes no melaço de soja, durante fermentação submersa para produção de ácido málico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PRODUÇÃO DA BIOMASSA MICELIAL

#### 4.1.1 Microrganismo e Matéria-Prima

##### 4.1.1.1 Manutenção da cepa fúngica e preparo de inóculo

O fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI foi mantido em meio ágar Sabouraud-cloranfenicol sob refrigeração (4 °C) através repiques sucessivos.

Para o preparo do inóculo uma porção de micélio de cultura estoque foi transferido para meio ágar Sabouraud-cloranfenicol e cultivado em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 h. O micélio crescido nas placas foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 ml de meio mineral de Vogel (MMV) (VOGEL, 1956) contendo 5 g L<sup>-1</sup> de glicose e incubado a 28 °C, 150 rpm por 48 h em agitador orbital (shaker). A biomassa micelial oriunda da pré-cultura foi homogeneizada assepticamente em liquidificador de forma a ser obtida uma suspensão micelial concentrada. A suspensão micelial foi diluída em solução salina (0,9% m/v) esterilizada de forma a ser obtida uma suspensão com concentração padronizada com leituras de absorção em 400 nm entre 0,4 e 0,5.

##### 4.1.1.2 Clarificação do melaço de soja

A clarificação foi realizada com o intuito de melhorar as condições de fermentação do melaço de soja. Inicialmente, o pH do melaço bruto foi ajustado para 3,0 com adição de ácido sulfúrico concentrado e submetido à agitação constante por 24 horas a 4 °C. Em seguida, o melaço foi centrifugado a 1500 g por 30 min e o pH do sobrenadante obtido foi ajustado para 5,5 com solução de hidróxido de sódio 6 mol L<sup>-1</sup>, sendo novamente centrifugado. O sobrenadante resultante (melaço clarificado) foi utilizado para os ensaios de produção da biomassa.

##### 4.1.1.3 Preparo do extrato de farelo arroz



O extrato de farelo de arroz foi preparado na concentração de 200 g L<sup>-1</sup>. A suspensão aquosa foi autolisada em autoclave à 121 °C, 1 atm de pressão por 15 min. A mistura foi resfriada e centrifugada à temperatura ambiente (1500 x g) por 30 min., e o sobrenadante resultante foi transferido para frascos reagente estéreis para uso posterior como fonte de nitrogênio nos cultivos.

#### 4.1.2 Cultivo Submerso para Produção de Biomassa Micelial e Coprodução de Lasiodiplodana

A produção de biomassa micelial de *L. theobromae* MMPI em meio sintético a base de sacarose e em meio a base de melaço de soja foi avaliada através de experimentos conduzidos de acordo com metodologia de planejamento experimental. Delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>3</sup>) foi empregado para estudar a influência das variáveis concentração de substrato (fonte de carbono), concentração de extrato de farelo de arroz (fonte de nitrogênio) e velocidade de agitação sobre o crescimento micelial (produção de biomassa celular).

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio sintético a base de sacarose, ou meio formulado com o subproduto melaço de soja. Um volume 10 mL do inóculo previamente padronizado foi adicionado aos meios de cultivo previamente preparados e os frascos foram incubados em incubadora orbital (*shaker*) por 96 h a 28 °C de temperatura.

O pH inicial dos meios de cultivo foi ajustado para 5,5 com solução HCl 1 mol L<sup>-1</sup> ou NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>. O meio sintético foi constituído por sacarose e extrato de farelo de arroz seguindo as concentrações descritas no delineamento experimental (Tabela 2) e suplementado com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g L<sup>-1</sup>) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2 g L<sup>-1</sup>).

O meio a base de melaço foi formulado com melaço de soja e extrato de farelo de arroz nas concentrações descritas no delineamento experimental e suplementado com os sais minerais descritos acima. A biossíntese da lasiodiplodana foi considerada como uma coprodução inerente ao processo de cultivo e crescimento celular do fungo *L. theobromae* MMPI nos dois meios estudados.

Tabela 2 - Planejamento experimental – DCCR 2<sup>3</sup>

Experimentos	Variáveis independentes*				
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>		
1	-1	-1	-1		
2	-1	-1	1		
3	-1	1	-1		
4	-1	1	1		
5	1	-1	-1		
6	1	-1	1		
7	1	1	-1		
8	1	1	1		
9	-1,68	0	0		
10	1,68	0	0		
11	0	-1,68	0		
12	0	1,68	0		
13	0	0	-1,68		
14	0	0	1,68		
15 (C)	0	0	0		
16 (C)	0	0	0		
17 (C)	0	0	0		
18(C)	0	0	0		

Variáveis		Níveis (valores reais)				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Concentração de substrato (g L <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	6,4	20	40	60	73,6
Extrato de farelo de arroz (v/v)	X <sub>2</sub>	1,6	5	10	15	18,4
Agitação (rpm)	X <sub>3</sub>	99,6	120	150	180	200,4

\*Valores codificados.

Fonte: Autoria própria (2022).

#### 4.1.3 Métodos Analíticos

##### 4.1.3.1 Determinação do teor de biomassa fúngica

O caldo fermentado foi separado da biomassa por centrifugação a 1500 x g/ 15 min. Em seguida, a biomassa fúngica foi lavada com água destilada a 60 °C até completa remoção da lasiodiplodana aderida ao micélio e então foi seco em estufa com circulação de ar a 50 °C até massa constante. Depois de seco, o teor de biomassa foi determinado por gravimetria.

##### 4.1.3.2 Determinação de produção de Lasiodiplodana

O exopolissacarídeo (EPS) lasiodiplodana foi separado do caldo fermentativo por precipitação em três volumes de etanol (95%) a 5 °C, *overnight*. O EPS precipitado foi seco em estufa com circulação de ar a 50 °C até massa constante. Após seco, o EPS foi quantificado por gravimetria.

#### 4.1.3.3 Determinação do consumo do substrato

Açúcares residuais totais foram determinados pelo método Fenol-Sulfúrico, descrito por Dubois *et al.* (1956) no meio fermentativo após remoção do exopolissacarídeo e secagem em estufa com circulação de ar 60 °C.

#### 4.1.3.4 Determinação dos parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos ao final dos experimentos do planejamento experimental serão determinados conforme equações abaixo:

##### 1) Fator de conversão (rendimento) do substrato em Biomassa ( $Y_{X/S}$ )

Determinado pela relação entre a quantidade de biomassa produzida ( $X$ ) e a correspondente variação do substrato ( $S$ ).

$$Y_{X/S} = \frac{\text{biomassa celular (g/L)}}{\text{consumo de substrato (g/L)}} \quad (1)$$

##### 2) Fator de conversão (rendimento) do substrato em exopolissacarídeo ( $Y_{P/S}$ ):

Determinado pela relação entre a quantidade de lasiodiplodana produzida e a correspondente variação do substrato ( $S$ ).

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Exopolissacarídeo(g/L)}}{\text{consumo de substrato (g/L)}} \quad (2)$$

##### 3) Produtividade volumétrica em biomassa ( $Q_X$ )

Foi determinada pela razão entre a quantidade de biomassa produzida e o intervalo de tempo correspondente.

$$Q_x = \frac{\text{biomassa celular (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}} \quad (3)$$

#### 4) Produtividade volumétrica em exopolissacarídeo ( $Q_P$ )

Foi determinada pela razão entre a quantidade de lasiodiplodana produzida e o intervalo do tempo correspondente.

$$Q_P = \frac{\text{exopolissacarídeo (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}} \quad (4)$$

#### 5) Percentual de consumo de substrato ( $Y_C$ )

O percentual de consumo de substrato foi determinado pela relação entre o conteúdo de substrato consumido ao longo da fermentação e o conteúdo inicial do mesmo.

$$Y_C = \left( \frac{\text{consumo de substrato (g/L)}}{\text{substrato inicial (g/L)}} \right) \times 100 \quad (5)$$

#### 6) Taxa total de consumo de substrato ( $Q_S$ )

Foi calculado a partir da razão do consumo de substrato pelo tempo.

$$Q_S = \frac{\text{consumo de substrato (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}} \quad (6)$$

#### 7) Rendimento específico ( $Y_e$ )

Calculado a partir da razão entre a produção de lasiodiplodana pela produção de biomassa celular.

$$Y_e = \frac{\text{lasiodiplodana (g/L)}}{\text{biomassa celular (g/L)}} \quad (7)$$

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS

### 4.2.1 Composição Proximal

A composição proximal das biomassas foi determinada quanto a umidade, resíduo mineral fixo, Proteína bruta, conteúdo de lipídios totais, fibra bruta e fibra alimentar.

#### 4.2.1.1 Umidade

A umidade das amostras foi determinada em triplicata conforme descrito pelo método oficial da AOAC, número 925.10, no qual 5 g de cada biomassa foram secos em estufa com circulação de ar a 105 °C até massa constante (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

#### 4.2.1.2 Resíduo mineral fixo

O resíduo mineral fixo foi determinado após incineração das amostras em forno mufla a 550 °C, através de método gravimétrico, conforme metodologia descrita pela AOAC 923.03 (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

#### 4.2.1.3 Lipídeos

A determinação de lipídeos totais foi realizada pelo método gravimétrico (Soxhlet) conforme descrito por método AOAC 920.39c. A extração da fração lipídica com solvente extrator éter etílico foi em equipamento do tipo Soxhlet (extração por refluxo). Após extração o solvente foi evaporado em chapa aquecedora, e dessecador até massa constante da fração lipídica. O teor de lipídeos foi obtido pela relação da massa da fração lipídica seca com a massa inicial da amostra (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

#### 4.2.1.4 Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl, descrito pelo método AOAC 2001.11 (AOAC INTERNATIONAL, 2016), o qual consiste na determinação do teor de nitrogênio total e posterior conversão para proteínas por fator de correção (6,25). A análise foi realizada em três principais etapas consecutivas: digestão, destilação e titulação. A digestão foi realizada em bloco

digestor (450 °C) utilizando 0,2 g de amostra, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (P.A) e mistura catalítica (Dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). Na etapa de destilação, foram adicionados 20 mL de solução de hidróxido de sódio (40% m/v) e, a amônia foi destilada sobre 10 mL de uma solução de ácido bórico (3%), na presença de indicador vermelho de metila. o borato de amônia formado na etapa anterior foi titulado com uma solução padronizada de ácido clorídrico (0,1 mol L<sup>-1</sup>), e o teor de proteínas foi determinado pela equação a seguir:

$$\text{Proteína total (\%)} = V \times M \times 0,014 \times 6,25 \times 100$$

(8)

Em que:

- V = volume gasto de HCl
- M = molaridade do HCl
- 0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio
- 6,25 = fator de conversão geral do nitrogênio em proteína

#### 4.2.1.5 Fibra bruta

Para a determinação de fibra bruta, as amostras foram submetidas a digestão ácida e alcalina, e logo após filtradas em cadinho de Gocch. Os teores de fibra bruta foram determinados por gravimetria, como descrito pela metodologia da OACS Ba 6a-05 (AOCS, 2017).

#### 4.2.1.6 Teor de fibra alimentar

Foi determinado pelo método enzimático-gravimétrico, o qual está descrito na AOAC sob o número 991.43 (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

#### 4.2.2 Perfil de Aminoácidos e Composição de Lipídios

O perfil de aminoácidos das biomassas fúngicas foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com protocolo descrito por Hagen,

Frost e Augustin (1989) e White, Hart e Fry (1986) . A composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa seguindo método oficial de análise 996.06 da Association of Analytical Chemists (AOAC INTERNATIONAL, 2016).

#### 4.2.3 Avaliação de Fenólicos Totais, Atividade Antioxidante e Compostos Bioativos

##### 4.2.3.1 Extração de compostos bioativos

Extratos hidroalcoólicos foram obtidos através de extração com solução etanólica a 80% (v/v). As extrações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, empregando a proporção de 1 g de biomassa liofilizada para 10 mL de solução hidroalcoólica, tempo de extração de 1 hora e temperatura de 60 °C em banho ultrassom. Os extratos das biomassas foram filtrados em papel de filtro e empregados nas análises de fenólicos totais, compostos bioativos e atividade antioxidante (STOFFEL *et al.*, 2019).

##### 4.2.3.2 Conteúdo fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Um volume de 0,5 mL de extrato etanólico foi transferido para tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu (1:10, v/v) e após 5 minutos de repouso foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% (v/v). Em seguida, os tubos foram mantidos em repouso durante 2 horas, ao abrigo da luz, e realizada leitura em espectrofotômetro a 740 nm. Para o branco substituiu-se a amostra por 0.5 mL de água. Os resultados foram calculados com base em uma curva de calibração utilizando ácido gálico nas concentrações de 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, 40,0, 70,0, 85,0, 100,0 e 125,0 ppm como padrão de referência. Os resultados foram expressos em mg ácido gálico equivalente / g.

##### 4.2.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

Em um tubo de ensaio, foram adicionadas as seguintes substâncias: 0,5 mL do extrato de biomassa, 3 mL de etanol e 0,3 mL de solução radical DPPH em

etanol ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A mistura foi mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante 45 min. Em seguida, a absorbância da mistura foi medida em um espectrofotômetro a 517 nm. A amostra controle foi preparada com 3,5 mL de etanol: água (80:20 v/v) e 300  $\mu\text{L}$  da solução DPPH ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A capacidade de eliminação do radical DPPH foi medida por correlação com curva de calibração usando Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como padrão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes Trolox por grama (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

#### 4.2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS

O radical ABTS foi obtido a partir da reação de 5 mL de ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com 88  $\mu\text{L}$  de solução de persulfato de potássio ( $140 \text{ mmol L}^{-1}$ ), na ausência de luz por 16 horas. A solução do radical ABTS foi diluída em etanol até absorbância de 0,700 a 734 nm. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de amostra devidamente diluída e 3 mL de solução contendo o radical ABTS. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro, a 734 nm após 6 min de reação, e o etanol foi usado como controle em branco. A quantificação foi realizada usando a curva padrão de Trolox e os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox por grama (RE *et al.*, 1999).

#### 4.2.3.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP

O poder redutor do íon férrico foi avaliado segundo Benzie e Strain (1996). O reagente FRAP foi obtido a partir de uma mistura de 25 mL de tampão acetato ( $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ ), 2,5 mL de solução TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina) ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  do extrato de biomassa ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 2,7 mL de reagente FRAP. A mistura foi mantida em banho-maria a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min e, em seguida, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 595 nm e o FRAP foi usado como controle em branco. O poder redutor do Fe (III) a Fe (II) foi expressa em mmol  $\text{FeSO}_4$  por grama.



#### 4.2.3.6 Sequestro do radical hidroxila

O potencial de sequestro de OH• foi avaliado com base no protocolo descrito por Liu *et al.* (2010). Foi obtida uma mistura reacional (2 mL) contendo 0,5 mL de FeSO<sub>4</sub> (1,5 mmol L<sup>-1</sup>), 0,35 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mmol L<sup>-1</sup>), 0,15 mL de salicilado de sódio (20 mmol L<sup>-1</sup>) e 1 mL da amostra em diferentes concentrações (0,10, 0,18 e 0,26 mg mL<sup>-1</sup>). Como controle positivo foi utilizado ácido ascórbico. Após repouso por 1 hora a 37 °C as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 562 nm. As análises foram realizadas em triplicata e o percentual de sequestro do radical hidroxila foi determinado, segundo equação:

$$\% \text{ de Remoção de OH} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Abs.da amostra} - \text{abs.do branco}}{\text{Absorbância do controle}} \right) \right] \times 100 \quad (9)$$

#### 4.2.3.7 Capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total foi avaliada utilizando o método de redução do complexo fosfomolibidênio descrito por Sun *et al.* (2011). Foi preparado reagente fosfomolibidênio utilizando ácido sulfúrico 0,6 mol L<sup>-1</sup>, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM. Em tubos de ensaio foram adicionados 3 mL do reagente fosfomolibdenio com 0,3 mL de amostra devidamente diluída. Após os tubos foram incubados por 90 min em banho maria a 95 °C. os tubos foram resfriados e realizadas leituras espectrofotométricas a 695 nm. Curva utilizando ácido ascórbico foi construída para quantificar a capacidade antioxidante total.

#### 4.2.3.8 Análise de compostos bioativos por HPLC-PDA

A análise foi realizada usando um sistema 920 LC (Varian Inc., Walnut Creek, CA, EUA). O software Galaxie foi utilizado para controlar o amostrador automático, configurações de gradiente, DAD e aquisição de dados. Uma coluna C18 RP (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Eclipse Plus, Agilent Technologies, Wilmington, DE, EUA) foi empregue na análise, e mantida a 30 °C. Foram injetados volumes de 10 µL de extratos na concentração de 80 g L<sup>-1</sup>. A fase móvel consistiu em uma mistura gradiente de solvente A (solução aquosa de ácido acético a 2%) e solvente

B (acetonitrila 40% acidificado com solução aquosa de ácido acético a 2%), com uma vazão de 1 mL. O gradiente foi iniciado com 5% de solvente B e ajustado para 20% a 2 min; 25% de B aos 15 min; 85% de B aos 25 minutos mantidos por 5 minutos; 20% de B aos 33 min; 5% de B aos 36 min com 8 min de uma etapa de condicionamento. Na análise cromatográfica foram utilizados 16 padrões cromatográficos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido salicílico, ácido cinâmico, catequina, epicatequina, rutina, isoquercitina, astragalina, miricetina, quercetina e canferol) de compostos fenólicos com o objetivo de identificar os principais compostos presentes nos extratos. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com o de padrões cromatográficos autênticos e quantificados pela integração dos respectivos picos cromatográficos. Os comprimentos de onda utilizados na detecção dos compostos 280 nm para os ácidos gálico e vanílico, bem como para catequina e epicatequina; 300 nm para os ácidos *p*-cumárico e salicílico; 320 nm para os ácidos cafeico, cinâmico, clorogênico e ferúlico e 360 nm para astragalina, isoquercitina, quercetina, canferol, miricetina e rutina.

#### 4.2.4 Microscopia Eletrônica De Varredura – MEV

Os aspectos morfológicos das biomassas e da lasiodiplodana obtidas do cultivo do fungo *L. theobromae* MMPI nos meios a base de melaço de soja e sacarose foram investigados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram colocadas sobre fita de carbono e as imagens de MEV foram obtidas em microscópio eletrônico de bancada modelo TM3000 (Hitachi, Irving, TX EUA) nas amplitudes de 200 X, 600 X e 1000 X, usando tensões de 5 a 15 k.

#### 4.2.5 Análise Termogravimétrica

O comportamento térmico das amostras de biomassas e lasiodiplodana obtidas dos cultivos em meio MMS e MSAC foi analisado em um analisador térmico SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Os teores de massa residual das amostras foram monitorados em uma faixa de temperatura que variou de 25 a 800 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min e vazão de ar sintético de 50 mL/min.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CO-PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL E $\beta$ -GLUCANA PELO FUNGO *L. theobromae* MMPI

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados referentes a produção e rendimento em biomassa micelial do fungo *L. theobromae* MMPI cultivado nos meios a base de sacarose (MSAC) e melação de soja (MMS).

O fungo *L. theobromae* MMPI cresceu em ambos os meios e em todas as condições de cultivo. Maiores produções de biomassa micelial foram obtidas nos meios formulados a base de melação de soja, conforme verificado nos ensaios 10 ( $P_x = 16,63 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 14 ( $P_x = 18,49 \text{ g.L}^{-1}$ ). Apreciáveis conteúdos de biomassa micelial também foram encontradas nos ensaios 6 ( $P_x = 11,40 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 8 ( $P_x = 14,86 \text{ g.L}^{-1}$ ) nos meios a base de sacarose, embora tais valores sejam inferiores aos encontrados no meio MMS.

Outro aspecto que deve ser evidenciado é o efeito das concentrações do substrato sobre o crescimento micelial ( $P_x$ ). Uma avaliação pontual dos ensaios 1 e 9 sugere que o uso de menores concentrações dos substratos melação de soja e sacarose promovem um menor crescimento micelial. De fato, nos ensaios 1 e 9 onde foram empregados os menores níveis (-1 e -1,68, respectivamente) de concentração de substrato, foram obtidos os menores valores de produção ( $P_x$ ).

Em relação ao parâmetro rendimento em biomassa micelial ( $Y_{x/s}$ ) as condições de cultivo empregadas nos ensaios 2 ( $Y_{x/s} = 0,67 \text{ g.g}^{-1}$ : meio MMS) e 3 ( $Y_{x/s} = 0,72 \text{ g.g}^{-1}$ : meio MSAC) promoveram os maiores valores de rendimento. Em contraponto ao verificado com a produção ( $P_x$ ), os valores de rendimentos máximos foram similares em ambos os meios.

Tabela 3 - Produção e rendimento em biomassa micelial em 96 horas de cultivo nos meios MMS e MSAC

Experimentos	Níveis das variáveis			Valores obtidos			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Melaço de soja (MMS)*		Sacarose (MSAC)**	
				P <sub>x</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	P <sub>x</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	3,450	0,202	3,160	0,404
2	-1	-1	1	10,627	0,667	4,633	0,348

3	-1	1	-1	6,580	0,353	8,360	0,721
4	-1	1	1	9,783	0,527	6,073	0,387
5	1	-1	-1	10,077	0,199	6,493	0,203
6	1	-1	1	10,583	0,205	11,400	0,354
7	1	1	-1	12,637	0,241	6,207	0,136
8	1	1	1	10,837	0,211	14,860	0,334
9	-1,68	0	0	2,443	0,426	3,183	0,653
10	1,68	0	0	16,627	0,282	11,103	0,262
11	0	-1,68	0	10,223	0,272	6,497	0,426
12	0	1,68	0	8,157	0,215	8,823	0,292
13	0	0	-1,68	8,927	0,236	5,937	0,184
14	0	0	1,68	18,490	0,538	5,997	0,227
15 (C)	0	0	0	8,110	0,230	11,205	0,423
16 (C)	0	0	0	9,315	0,259	10,930	0,424
17 (C)	0	0	0	9,475	0,251	9,425	0,351
18(C)	0	0	0	8,785	0,230	8,985	0,335

Variáveis	Níveis (valores reais)					
		-1,68	-1	0	1	1,68
substrato (g L <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	6,4	20	40	60	73,6
EFA (%)	X <sub>2</sub>	1,6	5	10	15	18,4
Agitação (rpm)	X <sub>3</sub>	99,6	120	150	180	200,4

Meios a base de: \*melaço de soja e \*\*sacarose como fontes de carbono.

Fonte: Autoria própria (2022).

Análise de variância (ANOVA) dos resultados do delineamento experimental relativos à produção micelial no meio MMS estão demonstrados na Apêndice A. Os dados experimentais foram analisados por regressão linear múltipla e o modelo matemático obtido foi significativo em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). O teste  $F$  indicou que o modelo gerado é preditivo, visto que o valor  $F$  calculado foi superior ao  $F$  tabelado. O coeficiente de determinação do modelo foi de 0,8147, o que indica que 81,47% da variabilidade dos dados pode ser explicada pelo modelo. Coeficientes de determinação acima de 75% podem ser considerados como adequados em modelos matemáticos que descrevem experimentos biológicos com células vivas.

O modelo matemático que representa o crescimento micelial ( $P_x$ ) nos cultivos em meio MMS descrito pela superfície de resposta (Figura 2) e considerando apenas as variáveis significativas ( $X_1$  e  $X_3$ ) foi:

$$(P_X) = 9,00175 + 5,49973 X_1 + 3,68684 X_3 \quad (10)$$

A análise de variância (ANOVA) dos resultados do delineamento experimental das fermentações em meio MSAC para produção micelial estão demonstrados no Apêndice B. O modelo matemático obtido por regressão linear múltipla (Equação 11) foi significativo em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), sendo verificado um valor  $F$  de 3,19 e um  $F$  tabelado de 9,01. Embora o coeficiente de determinação do modelo tenha sido relativamente elevado ( $R^2 = 0,8649$ ), o modelo não foi preditivo.

$$(P_X) = 10,0898 + 4,4030 X_1 + 2,0113 X_2 - 2,5514 X_3^2 + 3,5933 X_1 X_3 \quad (11)$$

As análises de variância (ANOVA) dos resultados dos delineamentos experimentais das fermentações nos meios MMS e MSAC para o rendimento em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ ) estão descritas nos Apêndices C e D, respectivamente.

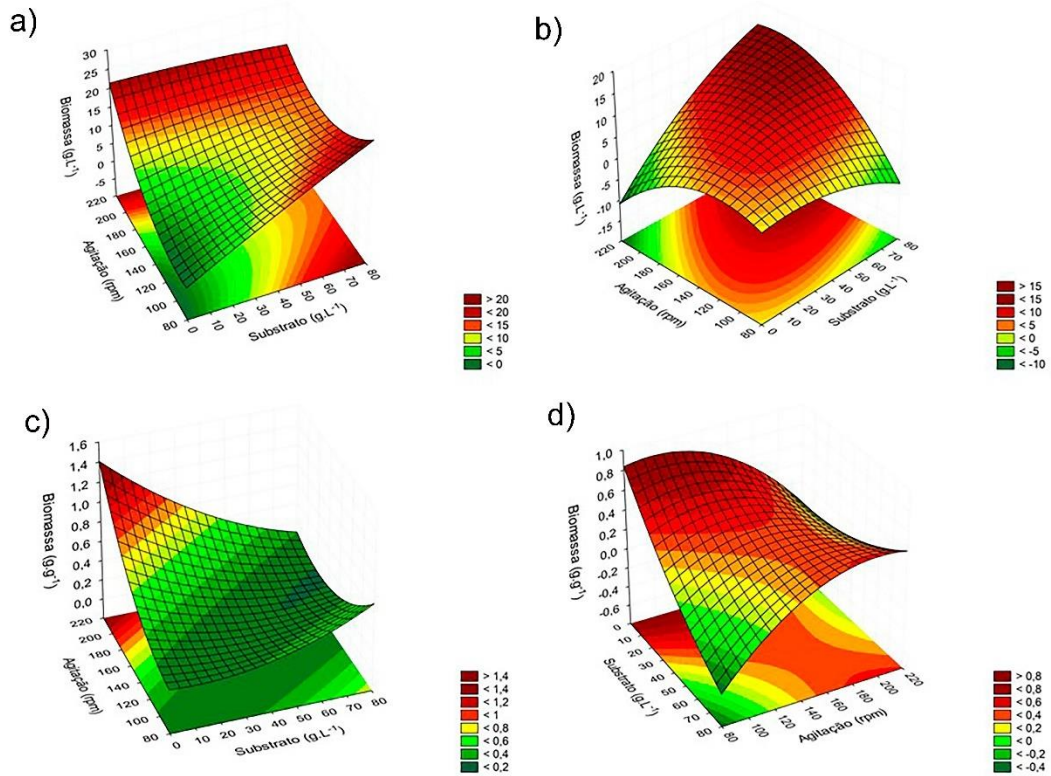
O modelo matemático do rendimento  $Y_{X/S}$  obtido em meio MMS foi significativo em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) e está descrito na Equação 12. O valor  $F$  calculado foi 23,85 e o  $F$  tabelado foi 9,01, sendo um modelo preditivo com 91,69% da variabilidade dos dados explicada pelo modelo ( $R^2 = 0,9169$ ).

$$(Y_{X/S}) = 0,2431 + 0,0985 X_3^2 - 0,1664 X_1 - 0,1644 X_3 - 0,1658 X_1 X_3 \quad (12)$$

Por outro lado, o modelo matemático do rendimento  $Y_{X/S}$  obtido em meio MSAC (Equação 13) não foi preditivo, sendo encontrado um  $F$  calculado de 3,12 e um  $F$  tabelado de 9,01 e coeficiente de determinação  $R^2$  de 0,8905.

$$(Y_{X/S}) = 0,3120 - 0,1159 X_3^2 - 0,2186 X_1 + 0,1847 X_1 X_3 \quad (13)$$

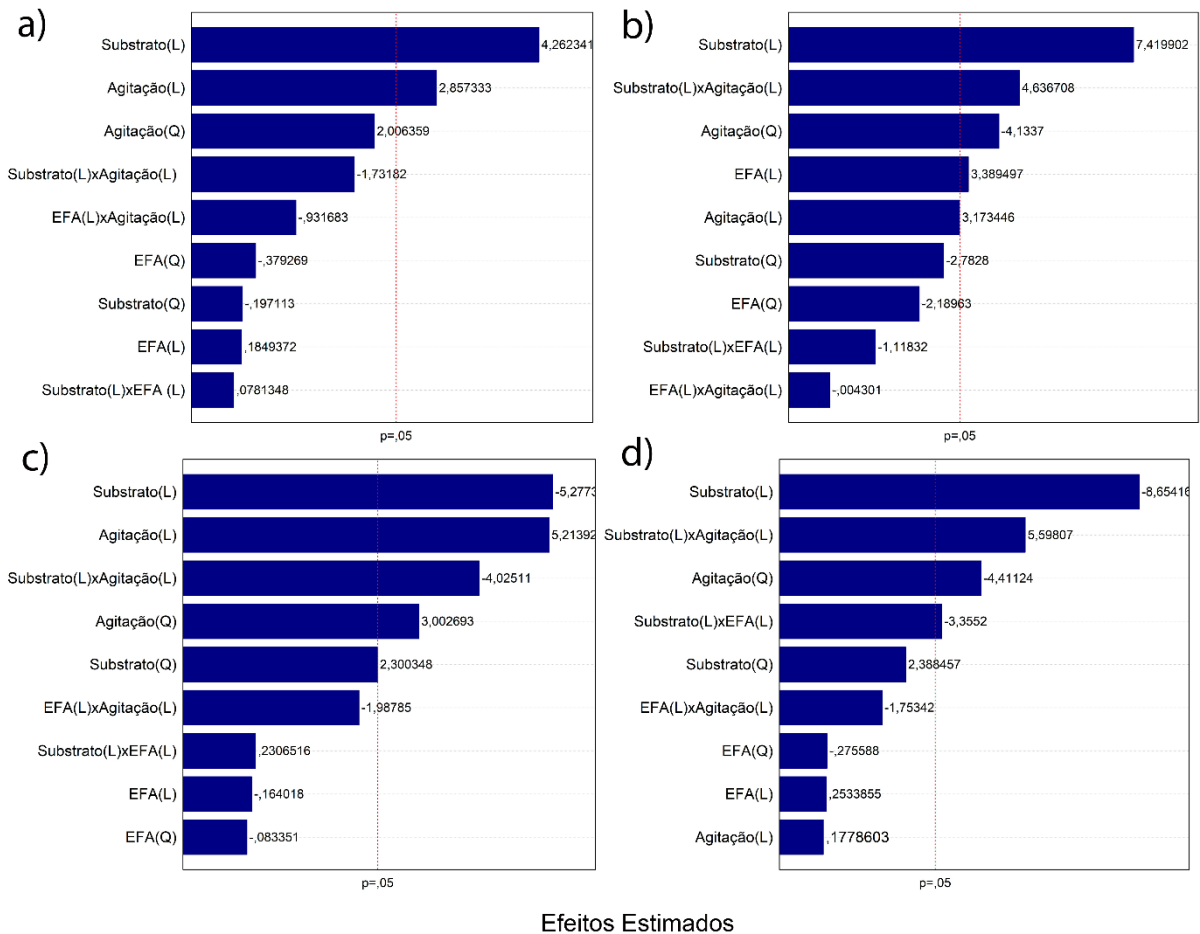
Figura 2 – Superfície de resposta para a produção ( $P_x$ ) e rendimento em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) nos meios formulados com melço de soja (a e c) e sacarose (b e d)



Superfície de resposta obtidas para as variáveis concentração de substrato e agitação (EFA = 10%).  
Fonte: Autoria própria (2022).

Para uma melhor visualização dos resultados do planejamento experimental, os efeitos principais de primeira e segunda ordem, e as interações entre as variáveis foram plotados em diagramas de Pareto (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a produção ( $P_X$ ) e rendimento em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) nos meios formulados com melação de soja (a e c) e sacarose (b e d)



Efeito sobre  $P_X$  nos meios a base de MMS (a) e MSAC (b), e  $Y_{X/S}$  nos meios MMS (c) e MSAC (d).  
Fonte: Autoria própria (2022).

Conforme pode ser verificado na Figura 3a, as variáveis concentração de melação de soja e agitação demonstraram influência estatisticamente positiva ao nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ) sobre o crescimento micelial ( $P_X$ ) (efeito linear positivo) no meio MMS. O efeito positivo de tais variáveis sobre a resposta indica que o aumento no valor destas variáveis dentro da faixa estudada contribuiu para a melhora na resposta.

Em relação ao crescimento micelial  $P_X$  verificada no meio MSAC (Figura 3b) as variáveis concentração de sacarose e concentração de extrato de farelo de arroz apresentaram influência positiva (efeito linear). Também foi verificada uma interação positiva de segunda ordem entre as variáveis concentração de substrato e agitação, que também pode ser observada na superfície de resposta apresentada na Figura 2. O efeito positivo do extrato de farelo de arroz sobre o crescimento micelial ocorreu

apenas quando sacarose foi empregada como substrato. Este fenômeno já era esperado uma vez que o melaço de soja é rico em fonte de nitrogênio e minerais, não necessitando de suplementação (ACOSTA *et al.*, 2020). Por outro lado, a agitação mostrou não contribuir para maior crescimento celular, sendo verificado um efeito negativo (efeito quadrático) desta variável sobre o crescimento no meio MSAC. O efeito negativo da agitação sobre o crescimento celular observado no meio à base de sacarose, possivelmente pode ser explicado pela maior produção da  $\beta$ -glucana (Tabela 4). A presença da  $\beta$ -glucana no meio promove intenso aumento de viscosidade, o que pode dificultar a transferência de oxigênio e consequente redução da taxa de respiração celular, levando a menor produção de energia e crescimento micelial.

Nos ensaios com melaço de soja houve influência significativa das variáveis concentração de substrato (efeito linear negativo) e agitação (efeitos linear e quadrático positivos), bem como um efeito negativo de interação entre tais variáveis sobre o rendimento em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ ) ao nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). Tal comportamento indica que dentro da faixa de estudo para a obtenção de melhores resultados de rendimento em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ ) é indicado usar menor concentração de melaço de soja associada a maior agitação. A forte influência (efeito linear e quadrático) da agitação sobre o rendimento em biomassa celular possivelmente está associada a uma provável maior transferência de oxigênio e a uma menor produção de  $\beta$ -glucana (Tabela 4). De fato, a presença de  $\beta$ -glucana no meio promove mudanças reológicas que podem ser desfavoráveis a conversão dos açúcares em biomassa celular (CUNHA *et al.*, 2012).

Similarmente ao observado no meio MMS, o diagrama de Pareto mostra uma influência negativa (efeito linear) da concentração do substrato em relação ao rendimento em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ ) em meio a base de sacarose (Figura 3d). Tal resultado indica que o aumento da concentração de açúcares no meio de cultivo não estimula a conversão substrato-biomassa, embora possa promover maior crescimento micelial ( $P_X$ ). No meio com sacarose (Figura 1d) tanto a concentração de substrato como a agitação mostraram efeitos negativos sobre o rendimento em biomassa micelial, o que possivelmente também se deve a produção de  $\beta$ -glucana que foi bem maior no meio com sacarose.



Na Tabela 4, estão apresentados os resultados referentes a produção e rendimento em lasiodiplodana [(1→6)-β-D-glucana] pelo fungo *L. theobromae* MMPI cultivado nos meios a base de melaço de soja e sacarose.

A lasiodiplodana foi produzida pelo fungo em ambos os meios e em todas as condições de cultivo. No experimento 5 foram obtidas as maiores produções de lasiodiplodana tanto no meio MMS ( $P_F$ : 3,49 g.L<sup>-1</sup>) como em MSAC ( $P_F$ : 5,70 g.L<sup>-1</sup>). Da mesma forma, melhores resultados de rendimento em lasiodiplodana ( $Y_{P/S}$ ) foram obtidos em ambos os meios quando empregadas as condições de cultivo do ensaio 1 ( $Y_{P/S}$  MMS: 0,154 g.g<sup>-1</sup> e  $Y_{P/S}$  MSAC: 0,290 g.g<sup>-1</sup>). Uma avaliação pontual dos experimentos 5 e 1 indica que para a obtenção de maiores resultados de produção e rendimento em lasiodiplodana é indicado utilizar os menores níveis das variáveis agitação e concentração de extrato de farelo de arroz. No caso do parâmetro rendimento em lasiodiplodana, para a obtenção de melhores resultados o emprego de menores concentrações de extrato de farelo de arroz e agitação deve estar associado ao uso de menores concentrações de substrato.

Tabela 4 - Produção ( $P_F$ ) e rendimento ( $Y_{P/S}$ ) em lasiodiplodana em 96 horas de cultivo nos meios MMS e MSAC

Experimentos	Níveis das variáveis			Valores obtidos			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Melaço de soja (MMS)*		Sacarose (MSAC)**	
				$P_F$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$P_F$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	2,640	0,154	2,267	0,290
2	-1	-1	1	1,520	0,095	0,827	0,062
3	-1	1	-1	1,120	0,060	3,333	0,287
4	-1	1	1	1,840	0,099	1,627	0,104
5	1	-1	-1	3,487	0,069	5,700	0,178
6	1	-1	1	1,893	0,037	1,813	0,056
7	1	1	-1	0,667	0,013	1,653	0,036
8	1	1	1	2,267	0,044	0,400	0,009
9	-1,68	0	0	0,427	0,074	0,240	0,049
10	1,68	0	0	0,533	0,009	1,013	0,024
11	0	-1,68	0	1,120	0,030	0,720	0,047
12	0	1,68	0	0,800	0,021	1,013	0,034
13	0	0	-1,68	1,093	0,029	0,800	0,025
14	0	0	1,68	2,320	0,067	1,493	0,056
15 (C)	0	0	0	0,560	0,016	0,760	0,029
16 (C)	0	0	0	0,800	0,022	1,560	0,060
17 (C)	0	0	0	0,520	0,014	1,000	0,037
18(C)	0	0	0	0,280	0,007	0,720	0,027

Variáveis	Níveis (valores reais)					
		-1,68	-1	0	1	1,68
substrato (g L <sup>-1</sup> )	$X_1$	6,4	20	40	60	73,6
EFA (%)	$X_2$	1,6	5	10	15	18,4
Agitação (rpm)	$X_3$	99,6	120	150	180	200,4

Meios a base de: \*melaço de soja e \*\*sacarose como fontes de carbono.

Fonte: Autoria própria (2022).

Análise de variância (ANOVA) dos resultados do delineamento experimental relativos à produção e rendimento em lasiodiplodana no meio MMS estão demonstrados nos Apêndices E e F. Os modelos de regressão obtidos tanto para a produção como rendimento em lasiodiplodana não foram significativos em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), indicando que não houve um bom ajuste de dados na faixa experimental estudada.

Embora nos cultivos em meio MSAC o modelo de regressão obtido para a produção de lasiodiplodana tenha apresentado significância estatística em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), não apresentou um bom ajuste de dados ( $R^2$ : 0,5279) (Apêndice G). Em relação ao rendimento em lasiodiplodana o modelo gerado pela regressão linear dos dados não apresentou significância estatística ao nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) (Apêndice H).

Considerando a falta de significância ou ajuste dos modelos gerados para a produção e rendimento em lasiodiplodana em ambos os meios, não foram procedidas avaliações dos efeitos das variáveis sobre as respostas através de diagramas de Pareto e superfícies de resposta.

## 5.2 VALIDAÇÃO DOS MODELOS PREDITIVOS E ESTUDO CINÉTICO DO CULTIVO DE *L. theobromae* MMPI EM MEIOS A BASE DE MELAÇO DE SOJA E SACAROSE

A validação dos modelos preditivos para produção ( $P_x$ ) e rendimento ( $Y_{x/s}$ ) em biomassa micelial foi realizada pela correlação entre os valores obtidos de produção e rendimento em biomassa micelial em um ensaio cinético de cultivo, onde foram empregados os valores críticos (valores otimizados pelo modelo) das variáveis concentração de substrato, concentração de extrato de farelo de arroz e agitação, descritos no modelo preditivo para rendimento máximo. O experimento de validação foi conduzido para verificar se os modelos preditivos eram adequados e o quanto as respostas preditas se aproximavam das respostas verificadas experimentalmente.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores críticos de ponto ótimo, valores preditos de produção e rendimento em biomassa celular, bem como seus respectivos valores experimentais.

Tabela 5 - Valores críticos e experimentais para o rendimento e produção de biomassa celular em meio a base de melão de soja e sacarose em 96 h de cultivo

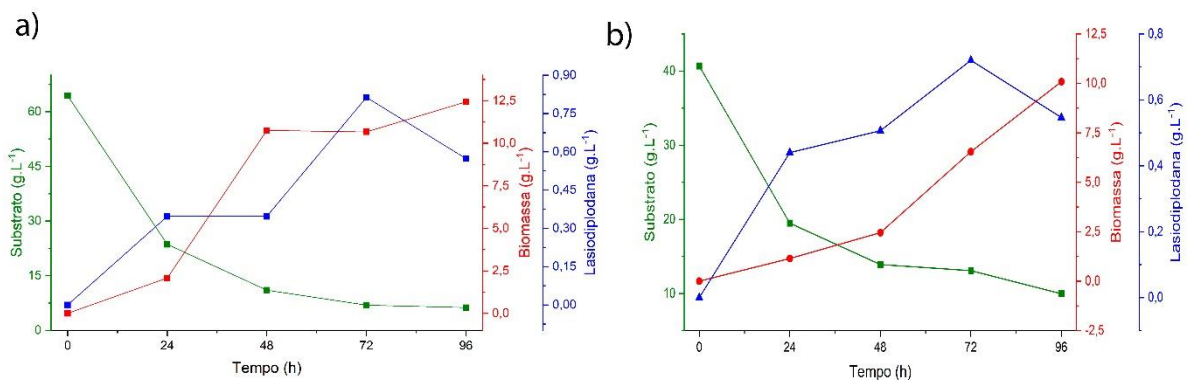
Variável	Melão de soja			Sacarose		
	Valor crítico	Valor experimental	% de recuperação	Valor crítico	Valor experimental	% de recuperação
Substrato (g.L <sup>-1</sup> )	64,43	64,43	-	40,68	40,68	
EFA (%)	8,81	8,81	-	3,44	3,44	
Agitação (rpm)	152,83	152,83	-	161,22	161,22	
Y <sub>x/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	0,196	0,214	109,2	0,378	0,328	86,8
P <sub>x</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	12,13	12,44	102,6	7,90	10,09	127,7

Fonte: Autoria Própria (2022).

Conforme pode ser observado na Tabela 5 houve uma boa correlação entre os valores estimados pelos modelos e os dados obtidos experimentalmente, tanto para o rendimento como para a produção de biomassa micelial em ambos os substratos (melão de soja ou sacarose). Quando melão foi empregado como substrato os dados experimentais mostram uma recuperação de 109% em relação aos valores preditos para rendimento em biomassa celular. Similarmente, em relação a produção de biomassa celular foi verificada uma recuperação de 102,6%. Quando sacarose foi o substrato limitante, os valores de recuperação foram de 86,8% (rendimento) e 127,7% (produção de biomassa micelial).

Na Figura 4 estão apresentados os perfis fermentativos observados no estudo cinético dos cultivos com meios a base de melão de soja (Figura 4a) e sacarose (Figura 4b) usando as condições de cultivo otimizadas pelo modelo de rendimento em biomassa micelial.

Figura 4 - Perfil fermentativo do fungo *L. theobromae* MMPI nos meios a base de (a) melão de soja e (b) sacarose



Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 6 - Parâmetros fermentativos em 96 h de cultivo com *L. theobromae* MMPI em meios a base de melação de soja e sacarose

Parâmetros fermentativos	Meio de Cultivo	
	MMS*	MSAC**
$P_X$ (g/L)	12,440 <sup>a</sup>	10,087 <sup>a</sup>
$P_F$ (g/L)	0,573 <sup>a</sup>	0,547 <sup>a</sup>
ATR (g/L)	6,275 <sup>b</sup>	9,964 <sup>a</sup>
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,010 <sup>a</sup>	0,018 <sup>a</sup>
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,214 <sup>a</sup>	0,328 <sup>a</sup>
$Y_e$ (g/g)	0,046 <sup>a</sup>	0,054 <sup>a</sup>
$Y_c$ (%)	90,261 <sup>a</sup>	75,507 <sup>b</sup>
$Q_X$ (g/L h)	0,130 <sup>a</sup>	0,105 <sup>a</sup>
$Q_P$ (g/L h)	0,006 <sup>a</sup>	0,006 <sup>a</sup>
$Q_S$ (g/L h)	0,606 <sup>a</sup>	0,320 <sup>b</sup>

\*MMS: meio a base de melação de soja; \*\*MSAC: meio a base de sacarose. Valores seguidos de mesma letra nas linhas não diferem significativamente ao nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ );  $P_X$ : produção de biomassa,  $P_F$ : produção de lasiodiplodana, ATR: Açúcares totais residuais,  $Y_{P/S}$ : conversão de substrato em lasiodiplodana,  $Y_{X/S}$ : conversão de substrato em biomassa,  $Y_e$ : rendimento específico,  $Y_c$ : percentual de consumo de substrato,  $Q_P$ : produtividade volumétrica em lasiodiplodana,  $Q_X$ : produtividade volumétrica em biomassa celular,  $Q_S$ : taxa global de substrato consumido.

Fonte: Autoria própria (2022).

O perfil de consumo de substrato, produção de biomassa micelial e lasiodiplodana foi similar em ambos os meios quando empregadas as condições otimizadas. Entretanto, em tais condições o melação de soja demonstrou desempenho um pouco superior como substrato, tanto para crescimento celular como para produção da lasiodiplodana. Em relação a lasiodiplodana, a produção máxima foi verificada em 72 horas de cultivo em meio a base de melação de soja (0,813 g.L<sup>-1</sup>). Similarmente, a máxima produção de biomassa celular foi encontrada em meio a base de melação de soja em 96 h (12,44 g.L<sup>-1</sup>) conforme descrito na Figura 4a e Tabela 6. Em relação a capacidade de assimilação dos açúcares o fungo foi eficiente em sua utilização. Nas primeiras 24 h de processo, já havia sido consumido 63% dos açúcares totais do melação de soja e 52% da sacarose. Após este período o substrato foi consumido de maneira gradativa até o final do processo (96 h), onde foi verificado máximo consumo no melação de soja ( $Y_c$ : 90,2%, Tabela 6). De fato, o melação de soja contribuiu para uma taxa mais efetiva de consumo global de substrato ( $Q_s$ : 0,606 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). O efetivo consumo do substrato em melação de soja indica que o fungo é produtor de enzimas que atuam sobre os

oligossacarídeos presentes no substrato, cuja composição inclui grande concentração deste tipo de açúcar, principalmente estaquiose (tetrassacarídeo), rafinose (trissacarídeo) e sacarose (dissacarídeo).

Em relação a produtividade volumétrica em lasiodiplodana ( $Q_P$ ) em 96 h de cultivo não houve diferenças entre os valores obtidos nos meios MMS e MSAC ( $0,006 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Por outro lado, o meio MMS promoveu uma produção mais efetiva de biomassa micelial comparado ao meio MSAC, o que é observado pela maior produtividade volumétrica em 96 h ( $Q_X$ :  $0,130 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

### 5.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL E PERFIL AMINOACÍDICO E ÁCIDOS GRAXOS DAS BIOMASSAS OBTIDAS DE *L. theobromae* MMPI

A composição proximal e o perfil de aminoácidos e ácidos graxos encontradas nas amostras liofilizadas de biomassa micelial de *L. theobromae* MMPI estão descritos na Tabela 7. Ambas as biomassas produzidas nos meios MMS e MSAC destacam-se quanto a qualidade nutricional, especialmente pelos conteúdos de proteína bruta ( $16,27 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  -  $19,88 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), fibra alimentar ( $7,5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  -  $17,0 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e resíduo mineral ( $5,79 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  -  $12,57 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Diferentes conteúdos de proteínas têm sido relatados em biomassas fúngicas, as quais comumente são reportadas como Single Cell Protein (SCP). Singh *et al.*, (2020) descreveram valores de 24,52% ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de proteína bruta em micélio liofilizado de *Pleurotus eryngii* cultivado em fermentações submersas em meio caldo batata dextrose. Fungos produtores de biomassas miceliais (SCP) com elevados conteúdos de proteínas têm sido descritos recentemente na literatura científica, o que é justificado pelo atual interesse industrial por fontes proteicas alternativas, as quais têm sido cultivadas tanto para alimentação humana quanto para ração animal (NYYSSÖLÄ *et al.*, 2022). O interesse pela produção de proteínas não convencionais tem aumentado devido ao crescimento mundial da população, a qual demanda por alimentos e suplementos com alta qualidade nutricional (CARRANZA-MÉNDEZ *et al.*, 2022).

Dependendo da espécie microbiana e das condições de cultivo empregadas no processo, a biomassa celular obtida por fermentação pode apresentar conteúdos de proteína que variam de 30 a 50% (NYYSSÖLÄ *et al.*, 2022). Neste contexto, Karimi *et al.*, (2019) reportaram concentrações de 44,7%, 57,6% e 50,9% em biomassas miceliais de *Aspergillus oryzae* CBS 819.72, *Neurospora intermedia* CBS

131.92 e *Rhizopus oryzae* CCUG61.147, respectivamente, cultivados em meio a base de vinhaça.

É importante destacar que as proteínas presentes nas biomassas obtidas em ambos os meios de cultivo estudados no presente trabalho apresentaram todos os aminoácidos essenciais, com exceção apenas da histidina na biomassa oriunda do meio à base de sacarose. Outro aspecto que merece destaque é que a biomassa oriunda do meio formulado com melaço de soja apresentou concentrações superiores de todos os aminoácidos essenciais, comparada a biomassa produzida em MSAC. Da mesma forma, em relação a cada um dos aminoácidos não essenciais identificados, a biomassa produzida em MMS apresentou maiores conteúdos. Leucina e lisina foram os aminoácidos presentes em maiores concentrações dentre os aminoácidos essenciais encontrados em ambas as biomassas (Tabela 7). A presença da leucina na dieta é necessária para estimular a síntese de proteína muscular e proteger os músculos de proteólise. A lisina tem muitas funções-chave no corpo, como manutenção do equilíbrio ácido-base, modificação do metabolismo de gorduras através da síntese de carnitina e importância na osmorregulação (KARIMI *et al.*, 2019a).

O maior conteúdo de fibra alimentar ( $17 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) observado na biomassa de *L. theobromae* MMPI cultivado em meio com sacarose em relação ao meio com melaço de soja ( $7,5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) pode ser justificado possivelmente em função da maior produção de lasiodiplodana obtida em meio com sacarose. De fato, mesmo lavando a biomassa micelial com água quente na etapa de separação da  $\beta$ -glucana do micélio no caldo de cultivo, elevado conteúdo da  $\beta$ -glucana ficou aderida ao micélio fúngico, e, portanto, fazendo parte de sua composição global e aumentando seu conteúdo de fibra alimentar. A presença de elevados conteúdos de fibra alimentar nas biomassas fúngicas associada aos demais componentes nutricionais presentes, podem torná-las atrativas como ingredientes na formulação de rações e mesmo produtos alimentícios.

Assim como observado com as fibras alimentares, a biomassa obtida no meio com sacarose também apresentou um maior conteúdo de elementos minerais em sua composição ( $17,0 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) comparada a biomassa oriunda do meio MMS ( $7,5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Tais minerais são oriundos do meio de cultivo, sendo absorvidos pela célula durante o cultivo. No caso da biomassa produzida em MSAC além da absorção celular de minerais do meio, possivelmente pode ter ocorrido interações

químicas entre íons minerais do meio e as hidroxilas da  $\beta$ -glucana (lasiodiplodana) aderida ao micélio. Macromoléculas de carboidrato podem interagir com íons inorgânicos, promovendo a reticulação da molécula e conseqüente formação de géis (BJØRNØY *et al.*, 2016). É bastante variável o conteúdo de minerais encontrado em biomassas fúngicas. Karimi *et al.* (2019) por exemplo, reportaram valores entre 5,07 g 100 g<sup>-1</sup> e 9,01 g 100 g<sup>-1</sup> em biomassas de *Aspergillus oryzae*, *Neurospora intermedia*, *Rizhopus oryzae*.

Em relação ao conteúdo de gordura verifica-se que a composição do meio de cultivo levou a produção de biomassas miceliais com diferentes concentrações de lipídios. Conteúdo bastante elevado de lipídios totais foi encontrado na biomassa oriunda do meio formulado com melaço de soja (43,76 g 100 g<sup>-1</sup>). Conteúdos lipídicos de 7.0%, 5.5% e 3.5% foram reportados por Karimi *et al.* (2019) em biomassas de *A. oryzae*, *R. oryzae* e *N. intermedia*, respectivamente. Tais autores mencionam que os constituintes e propriedades nutricionais das biomassas fúngicas estão significativamente relacionados com o meio e as condições de cultivo. Os mesmos autores observaram que a vinhaça teve um bom potencial para suportar a deposição de lipídios na biomassa fúngica.

Elevados conteúdos de lipídios em biomassas de fungos oleaginosos como *Aspergillus terreus* IBB M1 (62,08%), *Mucor plumbeus* (FRR no.: 2412) (37,0%), *Mucor Fragilis* AFT7-4 (46,8%), *Penicillium brevicompactum* NRC 829 (57,6%), *Mortierella isabellina* NRRL 1757 (47,6%) e *Aspergillus terreus* IBB M1 (53,98%) são mostrados no trabalho de Bardhan *et al.* (2019). Importante mencionar que a maioria dos microrganismos oleaginosos pertencem aos gêneros de leveduras, havendo poucos gêneros de fungos (*Aspergillus*, *Humicola*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Cunninghamella* e *Mucor*) capazes de alta síntese lipídica (ALTUN *et al.*, 2020).

O elevado conteúdo de lipídios presentes na biomassa de *L. theobromae* MMPI cultivada em melaço de soja sugere esta biomassa como uma matéria-prima alternativa para a produção de biodiesel. Neste sentido, nos últimos anos houve um aumento significativo no número de publicações relacionadas a produção de lipídios por fontes microbianas (leveduras, algas e fungos filamentosos). Há um grande interesse nos chamados microrganismos oleaginosos produtores de óleos de célula única ("Single cell Oils- SCOs"), definidos como microrganismos que acumulam quantidades de lipídios acima de 20% de seu peso seco (ATHENAKI *et al.*, 2018).



O emprego de biomassa microbiana como fonte renovável de combustível é uma alternativa tecnológica capaz de reduzir problemas ambientais. A crescente demanda e utilização de biocombustíveis à base de lipídios de primeira geração tem aumentado os custos de vários alimentos como, por exemplo, os óleos vegetais convencionais. Neste contexto, nos últimos anos há uma necessidade crescente de descoberta de fontes não convencionais de óleos e gorduras, que posteriormente possam ser convertidas em biodiesel ou diesel renovável (ATHENAKI *et al.*, 2018).

Outro aspecto que merece ser avaliado é a possibilidade de uso da biomassa produzida no meio de melaço de soja para extração de ácidos graxos, considerando seu conteúdo total e composição em ácidos graxos. Os SCOs podem ser empregados como substitutos de lipídios caros raramente encontrados no reino vegetal ou animal, como por exemplo, óleos contendo grandes quantidades do ácido gama-linolênico de importância médica ou outros ácidos graxos poliinsaturados nutricionalmente importantes (ATHENAKI *et al.*, 2018).

A biomassa produzida em melaço de soja apresentou uma composição rica em ácidos graxos insaturados ( $32,67 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ) com destaque para o conteúdo de poli-insaturados ( $27,42 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ), em especial os ácidos gama-linoleico ( $24,38 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ) e alfa-linolênico ( $2,99 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ). Ácido linoleico (23,67%) também foi o ácido graxo mais abundante na biomassa de *Galactomyces geotrichum* TS61 produzida em meio a base de melaço de cana-de-açúcar e recentemente reportado Altun *et al.*, (2020). O ácido gama-linolênico é considerado como um ácido graxo essencial em humanos e atua como um importante intermediário na biossíntese de derivados de prostaglandinas. O ácido linolênico é relatado como eficaz na prevenção ou cura de uma variedade de doenças, incluindo artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, hipercolestrolomia, eczema atópico e asma (ALI *et al.*, 2017).

Avaliando o balanço de ácidos graxos saturados é observado que na biomassa produzida em melaço de soja estes correspondem a 25,3% do total da gordura presente. Por outro lado, na biomassa oriunda do meio formulado a base de sacarose este score corresponde a 43,06%. De fato, a composição do meio teve grande influência no perfil de aminoácidos das biomassas de *L. theobromae* MMPI.

Entre o conteúdo de ácidos graxos saturados presentes nas amostras o ácido palmítico destaca-se, sendo encontradas quantidades de  $8,81 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$  e  $2,05 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ , respectivamente, nas biomassas produzidas em meio MMS e MSAC. O ácido palmítico, também conhecido como ácido hexadecanóico, tem sido por muito tempo

descrito negativamente por seus supostos efeitos prejudiciais à saúde, o que sombreia suas múltiplas atividades fisiológicas importantes (CARTA *et al.*, 2017). O ácido palmítico é o ácido graxo saturado mais comum e corresponde a 20-30% do total de ácidos graxos presentes no corpo humano, sendo fornecido na dieta ou sintetizado endogenamente via lipogênese de novo (DNL). Ele possui uma ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo atividades antivirais, anti-inflamatórias, analgésicas e reguladoras do metabolismo lipídico, além de promover a apoptose de células de neuroblastoma e células de câncer de mama, bem como potencial para inibir a proliferação de células de hepatoma e inibição da proliferação e metástase de células de câncer de próstata (ZHU *et al.*, 2021).

Outro aspecto interessante em relação a gorduras ricas em ácido palmítico é que podem ser interesterificadas para aumentar sua aplicabilidade na produção de determinados alimentos (VAN ROOIJEN; MENSINK, 2020).

Tabela 7 - Composição proximal e perfil de aminoácidos e ácidos graxos das biomassas miceliais de *L. theobromae* MMPI cultivadas em meio MMS e MSAC

Composição Proximal <sup>#</sup>					
	MMS*	MSAC**		MMS*	MSAC**
Umidade a 105 °C	9,5	9,7	Fibra alimentar	7,5	17,0
Proteína total	16,27	19,88	Carboidratos	17,18	33,28
Gorduras totais	43,79	7,57	Resíduo mineral	5,79	12,57
Valor Calórico (kcal/100g)	527,64	280,77			
Aminoácidos Essenciais <sup>##</sup>					
	MMS*	MSAC**		MMS*	MSAC**
Histidina	20,28	0,00	Fenilalanina	38,11	7,04
Isoleucina	49,17	16,10	Treonina	43,64	7,04
Leucina	97,11	39,24	Triptofano	8,60	6,04
Lisina	91,58	19,11	Valina	61,46	18,61
Metionina	25,20	7,04			
Aminoácidos não Essenciais <sup>##</sup>					
	MMS*	MSAC**		MMS*	MSAC**
Ácido Aspártico	119,85	30,18	Tirosina	29,50	2,01
Ácido Glutâmico	159,19	37,22	Glicina	51,63	8,05
Alanina	76,83	15,59	Prolina	1,23	0,00
Arginina	86,05	11,07	Serina	71,30	11,57
Cistina	15,98	0,00			
Ácidos Graxos Monoinsaturados (AGMI) <sup>#</sup>					
	MMS*	MSAC**		MMS*	MSAC**
Ácido Elaídico (C18:1n9t)	0,01	-	Ácido Palmítico (C16:1n7) (ω-7)	0,08	0,05
Ácido Oleico (C18:1n9c) (ω-9)	5,12	1,18			
Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) <sup>#</sup>					
	MMS*	MSAC**		MMS*	MSAC**
Ácido Linoleico (C18:2n6c) (ω-6)	24,38	2,24	Ácido Linolelaídico (C18:2n6t)	0,02	-
Ácido α-Linolênico (C18:3n3) (ω-3)	2,99	0,16	Ácido cis-11,14-Eicosadienóico (C20:2)	0,04	-
Ácido cis-11-Eicosenóico (C20:1n9)	0,04	0,01			
Ácidos graxos saturados (AGS) <sup>#</sup>					
	MMS*	MSAC**		MMS*	MSAC**
Ácido Mirístico (C14:0)	0,04	0,03	Ácido Caprílico (C8:0)	0,12	0,00
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0,04	0,01	Ácido Araquídico (C20:0)	0,06	0,05
Ácido Palmítico (C16:0)	8,81	2,05	Ácido Heneicosanóico (C21:0)	0,02	0,00
Ácido Margárico (C17:0)	0,07	0,01	Ácido Behenico (C22:0)	0,14	0,03
Ácido Esteárico (C18:0)	1,60	1,03	Ácido Tricosanóico (C23:0)	0,05	0,01
Ácido Lignocérico (C24:0)	0,14	0,03			
Gorduras Totais <sup>#</sup>					
	MMS*	MSAC**		MMS*	MSAC**
Gordura Monoinsaturada	5,25	1,91	Gorduras Saturadas	11,09	3,26
Gordura Poli-insaturada	27,42	2,40	Gordura trans	0,03	0,00
Gorduras Insaturadas	32,67	4,31			

Meios a base de: \*melaço de soja e \*\*sacarose como fontes de carbono; #gramas por 100 gramas de biomassa micelial seca (g 100 g<sup>-1</sup>); ##miligramas por grama de proteína (mg g<sup>-1</sup>); ###miligramas por 100 gramas de biomassa micelial (mg 100 g<sup>-1</sup>).

Fonte: Autoria própria (2022).

#### 5.4 FENÓLICOS TOTAIS E PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE-PDA

A presença de compostos fenólicos foi detectada nas biomassas de *L. theobromae* MMPI produzidas nos meios MMS e MSAC. Ambas as biomassas apresentaram quantidades similares de fenólicos totais, expressos em ácido gálico equivalente (GAE) por grama de biomassa seca e, determinados pelo método Folin-Ciocalteu. As concentrações de fenólicos totais encontradas são relativamente pequenas, principalmente quando comparadas a extratos vegetais, os quais são comumente ricos em compostos fenólicos (IURCKEVICZ *et al.*, 2019). As quantidades de compostos fenólicos encontradas no presente trabalho foram 4,22 mg GAE / g (biomassa MMS) e 4,14 mg GAE / g (biomassa MSAC). Quantidades superiores foram reportadas em biomassa de *Pleurotus ostreatus* PBS281009 (35,4 mg GAE/ g de biomassa) e *P. ostreatus* PSI101109 (98,6 mg GAE/ g de biomassa) cultivados em meio a base de glicose (VAMANU, 2014). Importante destacar que valores bastante diferentes de conteúdo de fenólicos em extratos de micélios fúngicos são relatados na literatura científica. Por exemplo, Valu *et al.*, (2020) encontraram conteúdos entre 11,1 e 23,1 mg GAE / g de extrato seco do corpo de frutificação do basidiomiceto *Hericium erinaceus* (cogumelo juba-de-leão).

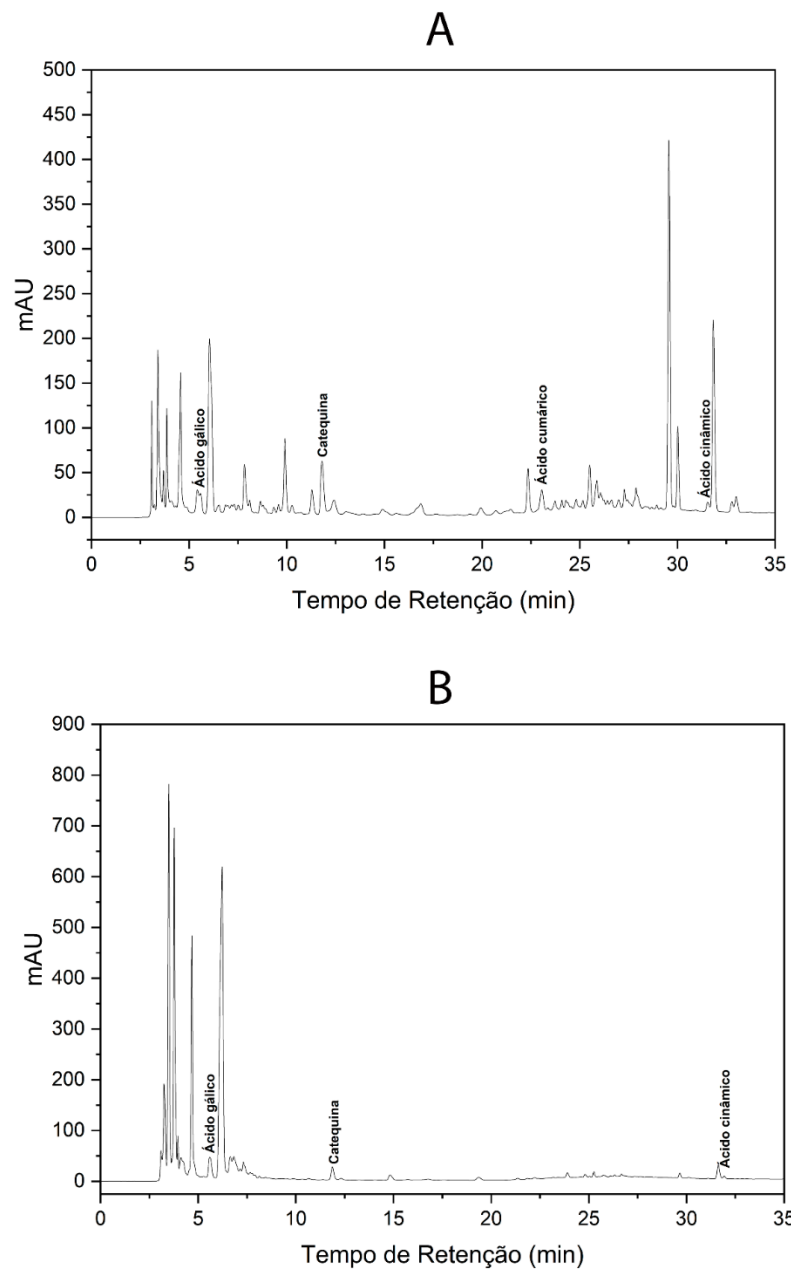
Em relação ao conteúdo de flavonóides totais quantidades de 3,4 mg QE (quercetina equivalente) / g e 3,69 mg QE / g foram encontradas nas biomassas produzidas nos meios MMS e MSAC, respectivamente. Tais resultados são consistentes com os reportados por Valu *et al.* (2020), os quais verificaram valores de 3,26 mg QE / g no cogumelo juba-de-leão. Concentrações de flavonóides entre 0,011 e 1,04 mg QE / g foram reportadas por González-Palma *et al.* (2016) em extratos de *Pleurotus ostreatus*.

O cromatograma CLAE-PAD descrito na Figura 5 e Tabela 8 revelou a presença de alguns biocompostos nos extratos das biomassas miceliais. No extrato obtido em meio de melaço de soja (Figura 5A) foi possível identificar os ácidos fenólicos: ácido gálico ( $152,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ), ácido cumárico ( $91,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e ácido cinâmico ( $12,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e o flavonóide catequina ( $533,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Os ácidos gálico ( $263,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e cinâmico ( $34,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) também foram encontrados na biomassa micelial produzida em meio a base de sacarose (Figura 5B), bem como o flavonóide catequina ( $323,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ). O ácido cumárico, por outro lado não foi encontrado na biomassa produzida

em meio a base de sacarose. Catequina e ácido gálico foram os compostos majoritários entre os biocompostos identificados nos extratos de biomassa de *L. theobromae* MMPI. Fljałkowska *et al.* (2020) também verificaram a presença de catequina (58,37 mg / 100 g de extrato) e ácido gálico (0,09 mg / 100 g de extrato) em extratos de micélio do fungo medicinal *Fomitopsis officinalis*

Estudos demonstram que as catequinas possuem muitos benefícios, como efeitos antioxidante, anticarcinogênico, antiapoptótico, anti-inflamatório, contribui para redução de reações inflamatórias e danos celulares, bem como peroxidação lipídica (ZHAO *et al.*, 2021). O ácido gálico (3,4,5-trihydroxybenzoic acid (CAS No.149-91-7)) tem sido reportado como um composto promotor da saúde, incluindo propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, cardioprotetora, anti-inflamatórias e antibacterianas, demonstrando efeitos gastroprotetores e neuroprotetores, podendo inibir a oxidação e rancificação de óleos e gorduras (KAHKESHANI *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2022).

Figura 5 - Cromatogramas CLAE-PAD do extrato das biomassas obtidas nos meios A) MMS e B) MSAC e compostos identificados



Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos dos compostos fenólicos detectados por CLAE-PAD

Composto fenólico	Tempo de retenção (min)	Comprimento de onda (nm)	R <sup>2</sup>	Concentração (µg g <sup>-1</sup> )	
				MMS	MSAC
Ácido gálico	5,81	271	0,9984	152,3	263,8
Catequina	12,18	278	0,9991	533,9	323,8
Ácido <i>p</i> -cumárico	23,23	308	0,9987	91,8	n.d
Ácido cinâmico	31,91	276	0,9914	12,2	34,1

n.d: não identificado.

Fonte: Autoria própria (2022).

## 5.5 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DAS BIOMASSA DE *L. theobromae* MMPI

Embora os extratos obtidos das biomassas produzidas nos meios MMS e MSAC tenham apresentado concentrações relativamente baixas de compostos fenólicos totais, apreciável capacidade antioxidante foi verificada por ensaios que avaliaram o potencial de captura dos radicais ABTS, DPPH e OH e capacidade de redução do íon férrico e redução do íon molibdênio VI com formação de complexo fosfomolibdênio (CAT).

Todos os extratos miceliais apresentaram efetiva capacidade eliminação dos radicais livres ABTS, DPPH e OH, além de habilidade de redução do íon férrico e do molibdênio VI (Tabela 9).

Os extratos miceliais produzidos em meio MMS (713,9 mM de trolox equivalente (TEq) / g de biomassa) e meio MSAC (741,89 mM TEq / g) mostraram elevado potencial de eliminação do radical cátion ABTS, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os extratos MMS e MSAC. Em relação ao potencial de eliminação do radical OH e poder redutor do íon férrico o meio de cultivo também não promoveu a produção de micélios com habilidades antioxidantes diferentes. Por outro, a biomassa micelial oriunda do meio formulado com sacarose (187,95 mmol TEq / g) demonstrou habilidade de eliminação do radical DPPH um pouco superior à observada no extrato da biomassa obtida em meio com melaço de soja (180,72 mmol TEq / g).

A atividade antioxidante total de extratos miceliais pode mostrar variações em relação aos diferentes extratos, processos de extração, meios de cultivo, tempo de fermentação e tipo de cepa (HAMEED *et al.*, 2017). Nesse sentido, em relação a atividade antiradicalar contra o radical ABTS, valores entre 25,4  $\mu\text{mol TEq / mg}$  de extrato e 89  $\mu\text{mol TEq / mg}$  de extrato foram encontrados em extratos de biomassa micelial de linhagens de *Cladosporium cladospoides* por (COUTTOLENC *et al.*, 2022). Estes autores também reportaram atividades entre 23,5  $\mu\text{mol TEq / mg}$  de extrato e 43,4  $\mu\text{mol TEq / mg}$  de extrato nos extratos de micélios de *Fusarium* sp. e *Cladosporium cladospoides* (P.f), respectivamente, contra o radical DPPH. Além disso, o respectivo trabalho mostra variações de concentrações de compostos fenólicos e atividade antiradicalar contra ABTS, DPPH e radical galvinoxil (2,6-Di-

terc-butil- $\alpha$ -(3,5-di-terc-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadieno-1-ilideno)-*p*-toliloxi), entre os extratos de micélios e os caldos de cultivos.

A atividade antioxidante total avaliada pela capacidade de redução do íon molibdênio VI e formação do complexo fosfomolibdênio foi bem superior no extrato obtido do micélio produzido em meio MMS (147,72 mmol de ácido ascórbico equivalente / g de biomassa) em relação ao micélio do meio MSAC (84,81 mmol de ácido ascórbico equivalente / g de biomassa). Um maior conteúdo de compostos lipofílicos, possivelmente, pode estar presente no extrato de biomassa produzida no meio MMS, visto que tal biomassa apresenta conteúdos de gordura (Tabela 7) bastante superior ao da biomassa produzida em meio MSAC. Tal condição pode justificar está maior atividade de redução do íon molibdênio VI. O método do complexo fosfomolibdênio é capaz de avaliar o potencial antioxidante de compostos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos.

O comportamento de eliminação do radical OH (MMS: 84,56 % e MSAC: 92,1%) bem como o poder redutor do íon férrico (MMS: 244,74 mmol de sulfato ferroso equivalente / g e MSAC: 230,81 mmol de sulfato ferroso equivalente / g) foram similares entre os extratos. Outro ponto a ser observado é que a capacidade de eliminação do radical hidroxila foi bastante elevada considerando uma eliminação de 100% de tal radical pelo padrão ácido ascórbico. Da mesma forma foi observado considerável potencial redutor do íon FRAP (MMS: 244,74 mmol de FeSO<sub>4</sub> equivalente / g e MSAC: 230,81 mmol de FeSO<sub>4</sub> equivalente / g). Atividades de 165,5 e 113,9 mmol de FeSO<sub>4</sub> equivalente / g foram reportadas em extratos metanólicos de primórdio fresco de *Pleurotus ostreatus* e em extrato aquoso do corpo de frutificação do fungo, respectivamente (GONZÁLEZ-PALMA *et al.*, 2016).

Tabela 9 - Potencial antioxidante dos extratos obtidos das biomassas de *L. theobromae* MMPI

Ensaio antioxidante	Resultados	
	MMS	MSAC
ABTS <sup>#</sup>	713,90 <sup>a</sup>	741,89 <sup>a</sup>
DPPH <sup>#</sup>	180,72 <sup>b</sup>	187,95 <sup>a</sup>
●OH <sup>##</sup>	84,56 <sup>a</sup>	92,10 <sup>a</sup>
FRAP <sup>###</sup>	244,74 <sup>a</sup>	230,81 <sup>a</sup>
CAT <sup>####</sup>	147,72 <sup>a</sup>	84,81 <sup>b</sup>

MMS: extrato da biomassa produzida em meio de melão de soja; MSAC: extrato da biomassa produzida em meio de sacarose; Valores seguidos de mesma letra nas linhas não diferem significativamente ao nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ); Resultados expressos em: <sup>#</sup> mmol de trolox equivalente / g de biomassa, <sup>##</sup> Percentual de redução do radical hidroxila em extratos diluídos 10 vezes, <sup>###</sup> mmol de sulfato ferroso equivalente / g de biomassa, <sup>####</sup> mmol de ácido ascórbico equivalente / g de biomassa.

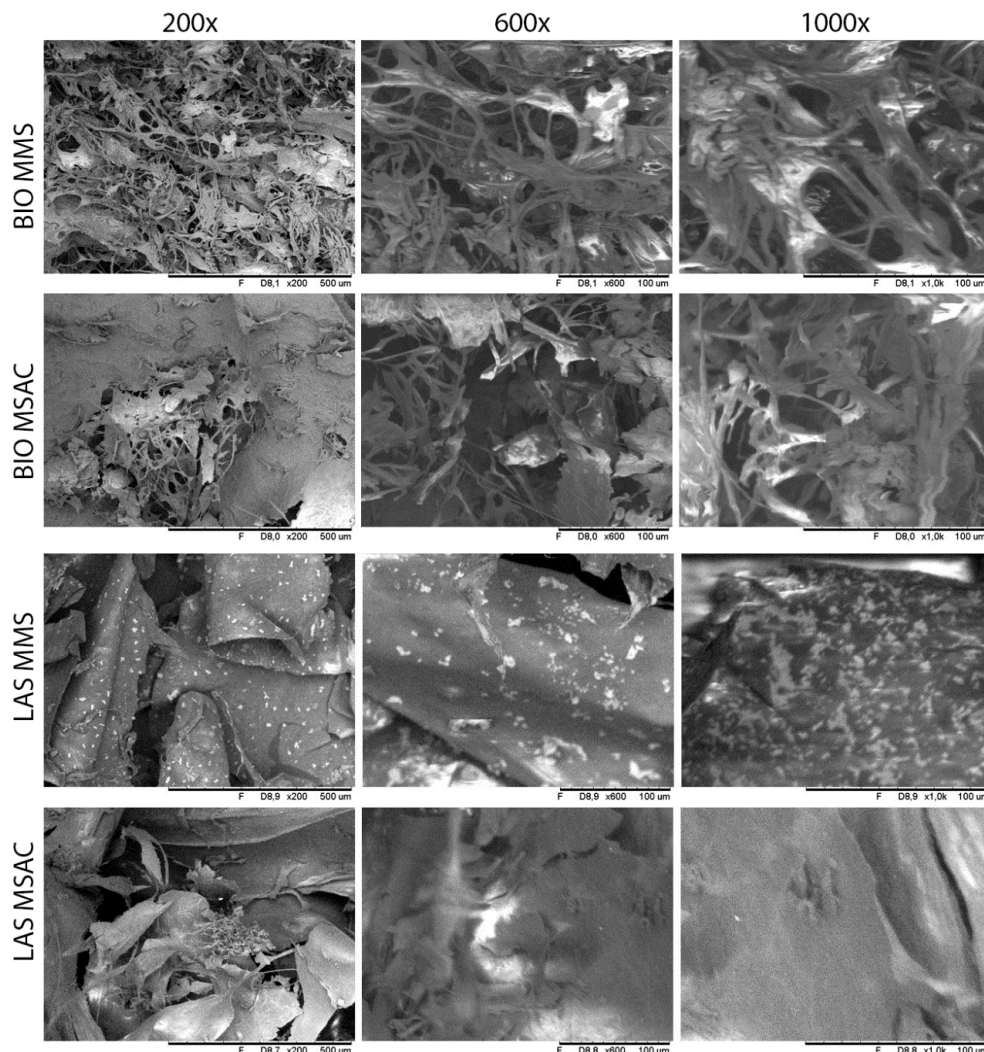
Fonte: Autoria própria (2022).



## 5.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS BIOMASSAS MICELIAIS E DA LASIODIPLODANA

As micrografias das amostras de biomassas miceliais (BIO MMS e BIO MSAC) e de lasiodiplodana (LAS MMS e LAS MSAC) obtidas a partir dos cultivos do fungo *L. theobromae* MMPI nos meios MMS e MSAC estão apresentadas na Figura 6 com ampliações de 200, 600 e 1000 vezes.

Figura 6 - Micrografias das amostras de biomassa (BIO MMS e BIO MSAC) e lasiodiplodana (LAS MMS e LAS MSAC)



Fonte: Autoria própria (2022).

As micrografias BIO MMS e BIO MSAC mostram redes de hifas entrelaçadas as quais formam a estrutura tridimensional que constitui o micélio fúngico. As

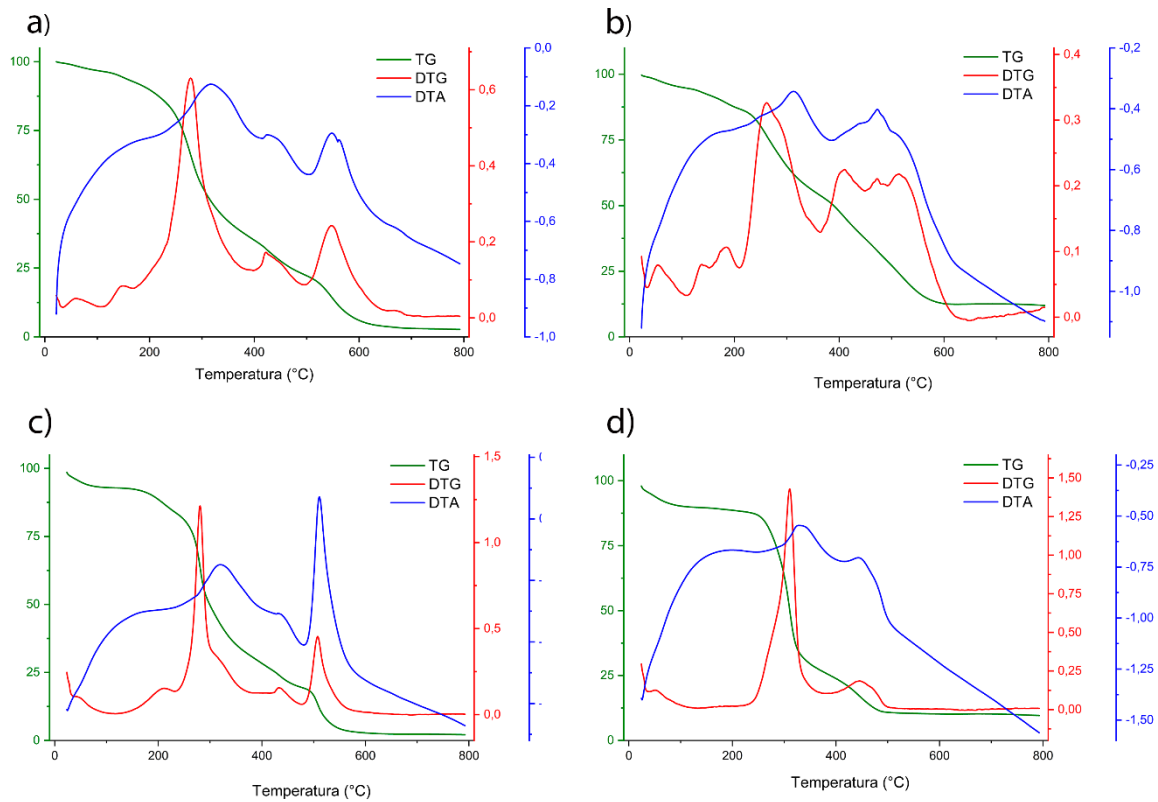
imagens de MEV sugerem que o micélio crescido no meio MMS apresenta uma rede de hifas mais contínua e emaranhada em comparação ao micélio crescido em meio MSAC. Parece haver um rompimento da estrutura fibrilar das hifas em algumas porções do micélio cultivado em meio MSAC. Outro aspecto que pode ser observado pela análise das imagens de MEV é a presença de material polimérico junto as hifas do micélio crescido em meio MSAC. Este material polimérico é atribuído a presença de lasiodiplodana a qual é produzida em grandes quantidades em meios a base de sacarose (CUNHA *et al.*, 2012)

As micrografias das amostras de lasiodiplodana produzidas nos meios contendo melaço de soja (LAS MMS) ou sacarose (LAS SAC) indicam que a composição do meio interfere na estrutura morfológica do biopolímero. As imagens da amostra de lasiodiplodana produzida em meio MMS mostram uma superfície irregular contendo dobras ao longo da área superficial. Outro aspecto que chama a atenção é a presença de pontos esbranquiçados ao longo da área superficial do biopolímero obtido em meio MMS. Tais manchas esbranquiçadas podem estar associadas a possível presença de íons inorgânicos como cálcio ou magnésio junto a estrutura do polissacarídeo. Estruturas macromoleculares ricas em hidroxilas podem formar redes tridimensionais por reticulação com íons bivalentes. Neste contexto o meio MMS contém sais minerais como cálcio e magnésio oriundos do melaço de soja (RODRIGUES *et al.*, 2021). A amostra LAS MSAC apresentou uma superfície um pouco mais irregular do que a amostra LAS MMS, sendo verificado áreas mais desuniformes com aspecto quebradiço.

## 5.7 PERFIL TÉRMICO DAS AMOSTRAS DE BIOMASSA E LASIODIPLODANA

Os perfis térmicos das amostras de biomassa e lasiodiplodana estão descritos na Figura 7, nas curvas termogravimétrica (TGA) e termogravimétrica derivada (DTG).

Figura 7 - Perfil térmico das biomassas (a e b) e da lasiodiplodana (c e d) produzidas em meio MMS e MSAC



- a) biomassa produzida em meio MMS; b) biomassa produzida em meio MSAC; c) lasiodiplodana produzida em meio MMS; d) lasiodiplodana produzida em meio MSAC.

Fonte: Autoria própria (2022).

O perfil térmico da biomassa obtida do cultivo em meio MMS (Figura 7a) apresentou um estágio de perda de massa (11%) de 25 °C a 170 °C com pico exotérmico em 50 °C na DTA. O segundo evento ocorreu entre 170 °C a 390 °C com pico em 316 °C na DTA e 54% de perda de massa. Posteriormente, entre 390 °C e 650 °C a perda de massa (32%) apresentou dois eventos consecutivos, com picos exotérmicos 427 °C e 549 °C na DTA.

A biomassa obtida do cultivo em meio MSAC (Figura 7b) apresentou um primeiro estágio com três eventos consecutivos de perda de massa (14%) entre 25 °C e 210 °C, com pico endotérmico em 50 °C na DTA. O segundo estágio ocorreu entre 210 °C e 362 °C com perda de massa de 32%, com pico exotérmico em 314 °C na DTA. O terceiro estágio de perda de massa (42%) apresentou três eventos consecutivos entre 362 °C a 649 °C, apresentando pico exotérmico em 471 °C na DTA.

Lasiodiplodana produzida no meio MMS (Figura 7c) mostrou quatro estágios de perda de massa. O primeiro estágio ocorreu até 100°C com perda de massa de 8%, indicada por um pico endotérmico a 50,5°C na curva DTA. Esta perda de massa corresponde à eliminação da água de hidratação. Um segundo evento de perda de massa ocorreu entre 133°C e 377°C resultando em uma redução de cerca de 60% na massa da amostra. Este evento é acompanhado por um pico exotérmico a 281°C na curva DTA e corresponde à decomposição inicial da macromolécula. Em temperaturas mais altas, foram observados dois eventos consecutivos com perdas de massa entre 424°C e 600°C, indicados por dois picos exotérmicos a 435°C e 508°C nas curvas DTA. A perda de massa com pico exotérmico a 435°C pode ser atribuída à degradação oxidativa, sendo que o último evento de perda de massa (pico exotérmico a 508°C) correspondeu à decomposição final (carbonização) da amostra.

A amostra de lasiodiplodana produzida em meio MSAC (Figura 7d) demonstrou 3 eventos de perda de massa. O primeiro indicado por um pico endotérmico (45 °C) na DTA ocorreu até cerca de 120 °C, com perda de 11% de massa. Um segundo correspondente a água de hidratação. O evento correspondente a decomposição inicial da molécula ocorreu de 150 °C a 373 °C, com pico exotérmico em 332 °C. nessa fase houve uma perda de 63% de massa. O ultimo evento, correspondente a degradação final da molécula ocorreu de 373 °C a 510 °C, com pico exotérmico na DTA em 440 °C, com perda de 16% de massa.

## 6 CONCLUSÕES

Os meios formulados com sacarose e o subproduto agroindustrial melaço de soja demonstraram potencial para produção integrada de biomassa micelial e  $\beta$ -glucana extracelular (lasiodiplodana). A bioprospecção do fungo *L. theobromae* MMPI parece demonstrar boas perspectivas industriais, considerando o elevado valor de mercado das  $\beta$ -glucanas e o potencial de aproveitamento tecnológico de biomassas fúngicas.

Melaço de soja demonstrou maior potencial para produção de biomassa micelial, em contrapartida, a sacarose contribuiu para maior produção da lasiodiplodana. As condições que promoveram maior crescimento micelial foram 64,43 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais, 8,81% de extrato de farelo de arroz e 152,83 rpm de agitação em meio base de melaço de soja. Em tal condição de cultivo é estimada uma produção de 12,44 g L<sup>-1</sup> de biomassa e 0,573 g L<sup>-1</sup> de lasiodiplodana.

A composição do meio de cultivo mostrou ter grande influência na qualidade nutricional das biomassas. As biomassas apresentaram apreciáveis conteúdos de proteínas, as quais continham todos os aminoácidos essenciais, exceto a histidina na biomassa produzida em meio com sacarose.

O melaço de soja promoveu a produção de biomassa rica em lipídios em especial os ácidos graxos insaturados, com destaque para o conteúdo de poli-insaturados como os ácidos gama-linoleico e alfa-linolênico.

Baixos conteúdos de fenólicos totais foram encontrados nas biomassas, entretanto seus extratos etanólicos apresentam considerável potencial antioxidante contra os radicais ABTS, DPPH, hidroxila e poder redutor dos íons férrico e molibdênio VI.

Ácido gálico e catequina foram os compostos majoritários entre os biocompostos identificados nos extratos. Ambas as biomassas apresentam estabilidade térmica considerando condições industriais comumente usadas em indústrias de alimentos e de rações.

O composição nutricional das biomassas miceliais produzidas sugerem estas como potenciais ingrediente na formulação de ração animal.

O fungo *L. theobromae* MMPI foi descrito pela primeira vez como um microrganismo oleaginoso quando cultivado em melaço de soja, o que abre

perspectivas de bioprospeção na área de biocombustíveis e ácidos graxos de elevado valor de mercado.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA, S. B. P. *et al.* Valorization of Soybean Molasses as Fermentation Substrate for the Production of Microbial Exocellular  $\beta$ -Glucan. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 8, p. 2149–2160, 2020.

AKANDE, A. O. *et al.* Silkworm pupae (*Bombyx mori*) and locusts as alternative protein sources for high-energy biscuits. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 1, p. 234–241, 1 jan. 2020.

ALI, T. H. *et al.* Improvement of lipid production from an oil-producing filamentous fungus, *Penicillium brevicompactum* NRC 829, through central composite statistical design. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 601–613, 1 set. 2017.

ALTUN, R. *et al.* Production of linoleic acid-rich lipids in molasses-based medium by oleaginous fungus *Galactomyces geotrichum* TS61. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 7, p. e14518, 1 jul. 2020.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 20. ed. Rockville, USA: AOAC INTERNATIONAL, 2016. v. 1

AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 7. ed. Urbana, USA: AOCS Press, 2017.

ASCHEMANN-WITZEL, J.; PESCHEL, A. O. Consumer perception of plant-based proteins: The value of source transparency for alternative protein ingredients. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 20–28, 1 nov. 2019.

ATHENAKI, M. *et al.* Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 336–367, 1 fev. 2018.

BARDHAN, P. *et al.* Microbial lipids from cellulolytic oleaginous fungus *Penicillium citrinum* PKB20 as a potential feedstock for biodiesel production. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 1135–1146, 1 nov. 2019.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 jul. 1996.

BERRYMAN, C. E. *et al.* Protein intake trends and conformity with the Dietary Reference Intakes in the United States: Analysis of the National Health and Nutrition

Examination Survey, 2001-2014. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 405–413, 2018.

BJØRNØY, S. H. *et al.* Gelling kinetics and in situ mineralization of alginate hydrogels: A correlative spatiotemporal characterization toolbox. **Acta Biomaterialia**, v. 44, p. 243–253, 15 out. 2016.

BOYE, J.; WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. SUPPL. 2, p. 183–211, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995.

CALDEIRÃO, L. *et al.* Modeling and kinetic study of bio-ethanol production from soy protein concentrate by-product. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 36, n. 2, p. 369–374, 2016.

CARRANZA-MÉNDEZ, R. C. *et al.* Production of single cell protein from orange peel residues by *Candida utilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40, p. 102298, 1 mar. 2022.

CARTA, G. *et al.* Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. NOV, 8 nov. 2017.

CHENG, C. *et al.* Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 166–174, jan. 2017.

COUTTOLENC, A. *et al.* Antioxidant capacity of fungi associated with corals and sponges of the reef system of Veracruz, Mexico. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 55, p. 40–46, 1 jan. 2022.

CUNHA, M. A. A. DA *et al.* Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- $\beta$ -d-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 1179–1188, 8 ago. 2012.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica: com correlações clínicas**. 7 Ed. ed. São Paulo: Blucher, 2011.



DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.

FASOLIN, L. H. *et al.* Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. **Food Research International**, v. 125, p. 108586, 1 nov. 2019.

FERREIRA, R. R. *et al.* Are high-lysine cereal crops still a challenge? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 985–994, jul. 2005.

FIJAŁKOWSKA, A. *et al.* Medicinal potential of mycelium and fruiting bodies of an arboreal mushroom *Fomitopsis officinalis* in therapy of lifestyle diseases. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 18 nov. 2020.

FINNIGAN, T.; NEEDHAM, L.; ABBOTT, C. Mycoprotein: A Healthy New Protein With a Low Environmental Impact. In: NADATHUR, S.; WANASUNDARA, J. P. D.; SCANLIN, L. (Eds.). . **Sustainable Protein Sources**. 1 Ed. ed. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 305–325.

GONZÁLEZ-PALMA, I. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1099, 12 jul. 2016.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912–916, 1 nov. 1989.

HAMEED, A. *et al.* Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients 2017, Vol. 9, Page 1101**, v. 9, n. 10, p. 1101, 7 out. 2017.

HASHEMPOUR-BALTORK, F. *et al.* Mycoproteins as safe meat substitutes. **Journal of Cleaner Production**, v. 253, p. 119958, 20 abr. 2020.

HUNTER, J. Investigation of symptoms reported after eating mycoprotein. In: **Interim report of 2 year study**. [s.l.] Marlow Foods Document, 2014.

IBARRURI, J.; HERNÁNDEZ, I. Valorization of cheese whey and orange molasses for fungal biomass production by submerged fermentation with *Rhizopus sp.* **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 8, p. 1285–1300, 2019.

IURCKEVICZ, G. *et al.* Encapsulated Microparticles of (1→6)-β-d-Glucan Containing Extract of *Baccharis dracunculifolia*: Production and characterization. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2099, 3 jun. 2019.

JOINT WHO/FAO/UNU EXPERT CONSULTATION. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organization technical report series**, n. 935, p. 1–265, back cover, 2007.

KAHKESHANI, N. *et al.* Pharmacological effects of gallic acid in health and disease: A mechanistic review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 225–237, 1 mar. 2019.

KARIMI, S. *et al.* Evaluation of Filamentous Fungal Biomass Cultivated on Vinasse as an Alternative Nutrient Source of Fish Feed: Protein, Lipid, and Mineral Composition. **Fermentation**, v. 5, n. 4, p. 99, 2019a.

KARIMI, S. *et al.* Evaluation of filamentous fungal biomass cultivated on vinasse as an alternative nutrient source of fish feed: Protein, lipid, and mineral composition. **Fermentation**, v. 5, n. 4, p. 99, 2 dez. 2019b.

LIU, W. *et al.* Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 4, p. 451–457, 1 maio 2010.

MITSUHASHI, S. Current topics in the biotechnological production of essential amino acids, functional amino acids, and dipeptides. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 38–44, 1 abr. 2014.

MORAIS, W. G. DE *et al.* Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26–34, 1 jul. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7 Ed. ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, 2018.

NYSSÖLÄ, A. *et al.* The role of single cell protein in cellular agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 75, p. 102686, jun. 2022.

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

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1 maio 1999.

REIHANI, S. F. S.; KHOSRAVI-DARANI, K. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 34–40, 1 jan. 2019.

RODRIGUES, B. C. G. *et al.* Soybean molasses as feedstock for sustainable generation of biomethane using high-rate anaerobic reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105226, 1 ago. 2021.

SÁ, A. G. A.; MORENO, Y. M. F.; CARCIOFI, B. A. M. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 170–184, 1 mar. 2020.

SILLMAN, J. *et al.* Bacterial protein for food and feed generated via renewable energy and direct air capture of CO<sub>2</sub>: Can it reduce land and water use? **Global Food Security**, v. 22, p. 25–32, 1 set. 2019.

SINGH, U. *et al.* Mass production of *Pleurotus eryngii* mycelia under submerged culture conditions with improved minerals and vitamin D<sub>2</sub>. **LWT**, v. 131, p. 109665, 1 set. 2020.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Journal of Food, Agriculture and Environment**. [s.l.] Academic Press, 1999. v. 5p. 152–178.

SIQUEIRA, P. F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, nov. 2008.

SOKOLOWSKI, C. M. *et al.* The relationship between animal and plant protein intake and overall diet quality in young adults. **Clinical Nutrition**, 30 nov. 2019.

SOUZA FILHO, P. F.; ZAMANI, A.; TAHERZADEH, M. J. Edible Protein Production by Filamentous Fungi using Starch Plant Wastewater. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 9, p. 2487–2496, 2019.

STOFFEL, F. *et al.* Production of edible mycoprotein using agroindustrial wastes: Influence on nutritional, chemical and biological properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 58, p. 102227, 1 dez. 2019.

SUMAN, G. *et al.* Single Cell Protein Production: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 9, p. 251–262, 2015.

SUN, L. *et al.* Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2689–2696, 1 out. 2011.

UNITED NATIONS, D. OF E. AND S. A. **World Urbanization Prospects: The 2018 Revision**. New York: United Nations, 2019.

VALU, M. V. *et al.* Optimization of ultrasonic extraction to obtain erinacine a and polyphenols with antioxidant activity from the fungal biomass of *hericium erinaceus*. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1889, 18 dez. 2020.

VAMANU, E. Antioxidant properties of mushroom mycelia obtained by batch cultivation and tocopherol content affected by extraction procedures. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

VAN ROOIJEN, M. A.; MENSINK, R. P. **Palmitic acid versus stearic acid: Effects of interesterification and intakes on cardiometabolic risk markers-a systematic review** *Nutrients* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 26 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/12/3/615/htm>>. Acesso em: 19 fev. 2022

VECCHI, L. **Consumo mundial de proteína animal – perspectivas e atitudes**. Disponível em: <<https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/49868/consumo-mundial-de-proteina-animl---perspectivas-e-atitudes.htm>>. Acesso em: 21 fev. 2020.

VOGEL, H. J. A Convenient Growth Medium for *Neurospora* (Medium and). **Microbial Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42–47, 1956.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–177, 1986.

XU, H. J. *et al.* Growth performance, digestibility, blood metabolites, ruminal fermentation, and bacterial communities in response to the inclusion of gallic acid in the starter feed of preweaning dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 0, n. 0, jan. 2022.

YANG, H. *et al.* Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 1–9, 1 fev. 2018.

ZHAO, Y. *et al.* Catechin from green tea had the potential to decrease the chlorpyrifos induced oxidative stress in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105028, 28 dez. 2021.

ZHU, S. *et al.* Palmitic acid inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis by suppressing the PI3K/Akt pathway. **Life Sciences**, v. 286, p. 120046, 1 dez. 2021.

**APÊNDICE A – ANOVA PARA PRODUÇÃO EM BIOMASSA MICELIAL DE *L. theobromae* MMPI EM MEIO MMS**

Tabela 10 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de biomassa celular em meio MMS

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	199,7712	9	22,1968	23,35	9.01
<b>Resíduo</b>	45,4342	8	5,6793	-	-
<b>Total</b>	245,2054	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>			0,81471		

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	<b>9,00175</b>	<b>0,000065</b>
Substrato (L)	<b>5,49973</b>	<b>0,002753</b>
Substrato (Q)	-0,26455	0,848655
EFA (L)	0,23863	0,857881
EFA (Q)	-0,50902	0,714357
Agitação (L)	<b>3,68684</b>	<b>0,021238</b>
Agitação (Q)	2,69275	0,079727
Substrato (L) x EFA (L)	0,13167	0,939640
Substrato (L) x Agitação (L)	-2,91833	0,121545
EFA (L) x Agitação (L)	-1,57000	0,378759

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022)

**APÊNDICE B – ANOVA PARA PRODUÇÃO EM BIOMASSA MICELIAL DE *L. theobromae* MMPI EM MEIO MSAC**

Tabela 11 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de biomassa celular em meio MSAC

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	145,7508	9	16,1945	3,19	9.01
<b>Resíduo</b>	22,7749	8	2,8469	-	-
<b>Total</b>	168,5257	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>			0,8649		

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	<b>10,08984</b>	<b>0,000348</b>
Substrato (L)	<b>4,40299</b>	<b>0,005065</b>
Substrato (Q)	-1,71761	0,068830
EFA (L)	<b>2,01134</b>	<b>0,042791</b>
EFA (Q)	-1,35149	0,116294
Agitação (L)	1,88313	0,050347
Agitação (Q)	<b>-2,55142</b>	<b>0,025690</b>
Substrato (L) x EFA (L)	-0,86667	0,344912
Substrato (L) x Agitação (L)	<b>3,59333</b>	<b>0,018902</b>
EFA (L) x Agitação (L)	-0,00333	0,996838

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022).

**APÊNDICE C – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM BIOMASSA MICELIAL DE *L. theobromae* MMPI EM MEIO MMS**

Tabela 12 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em biomassa celular em meio MMS

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	0,29970	9	0,03330	23,85	9.01
<b>Resíduo</b>	0,02716	8	0,00339	-	-
<b>Total</b>	0,32690	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>			0,91692		

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	<b>0,243128</b>	<b>0,000032</b>
Substrato (L)	<b>-0,166486</b>	<b>0,000749</b>
Substrato (Q)	0,075483	0,050443
EFA (L)	-0,005174	0,873785
EFA (Q)	-0,002735	0,935621
Agitação (L)	<b>0,164486</b>	<b>0,000809</b>
Agitação (Q)	<b>0,098530</b>	<b>0,017002</b>
Substrato (L) x EFA (L)	0,009503	0,823375
Substrato (L) x Agitação (L)	<b>-0,165836</b>	<b>0,003814</b>
EFA (L) x Agitação (L)	-0,081900	0,082045

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022).



**APÊNDICE D – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM BIOMASSA MICELIAL DE *L. theobromae* MMPI EM MEIO MSAC**

Tabela 13 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em biomassa celular em meio MSAC

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	0,33002	9	0,036669	3,12	9.01
<b>Resíduo</b>	0,04058	8	0,005073	-	-
<b>Total</b>	0,37060	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>			0,8905		

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	<b>0,382035</b>	<b>0,000005</b>
Substrato (L)	<b>-0,218648</b>	<b>0,000470</b>
Substrato (Q)	0,062767	0,156244
EFA (L)	0,006402	0,872265
EFA (Q)	-0,007242	0,861203
Agitação (L)	0,004494	0,910104
Agitação (Q)	<b>-0,115924</b>	<b>0,020194</b>
Substrato (L) x EFA (L)	-0,110708	0,059154
Substrato (L) x Agitação (L)	<b>0,184713</b>	<b>0,006330</b>
EFA (L) x Agitação (L)	-0,057856	0,283821

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022).

## APÊNDICE E – ANOVA PARA PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM MEIO MMS

Tabela 14 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de lasiodiplodana em meio MMS

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	10,0881	9	1,1209	15,71	9.01
<b>Resíduo</b>	3,6982	8	0,462275	-	-
<b>Total</b>	13,7863	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>	0,73175				

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	0,497542	0,180855
Substrato (L)	0,201180	0,599631
Substrato (Q)	0,326380	0,418790
EFA (L)	-0,613313	0,134269
EFA (Q)	0,666516	0,119921
Agitação (L)	0,244411	0,525404
Agitação (Q)	<b>1,195617</b>	<b>0,014175</b>
Substrato (L) x EFA (L)	-0,311667	0,534972
Substrato (L) x Agitação (L)	0,101667	0,837811
EFA (L) x Agitação (L)	<b>1,258333</b>	<b>0,030778</b>

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022).

## APÊNDICE F – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM LASIODIPLODANA EM MEIO MMS

Tabela 15 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em lasiodiplodana em meio MMS

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	0,021461	9	0,002385	26,95	9.01
<b>Resíduo</b>	0,005227	8	0,000653	-	-
<b>Total</b>	0,026689	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>			0,80413		

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	0,013246	0,329612
Substrato (L)	<b>-0,052267</b>	<b>0,005416</b>
Substrato (Q)	0,032774	0,052350
EFA (L)	-0,022535	0,142131
EFA (Q)	0,021234	0,178448
Agitação (L)	0,006464	0,652905
Agitação (Q)	<b>0,037313</b>	<b>0,032019</b>
Substrato (L) x EFA (L)	0,010532	0,576173
Substrato (L) x Agitação (L)	0,004820	0,796478
EFA (L) x Agitação (L)	0,040409	0,055809

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022).

## APÊNDICE G – ANOVA PARA PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM MEIO MSAC

Tabela 16 - ANOVA e efeitos principais estimados para a produção de lasiodiplodana em meio MSAC

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	14,75994	9	1,639993	17,03	9.01
<b>Resíduo</b>	13,19919	8	1,649899	-	-
<b>Total</b>	27,95913	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>	0,52791				

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	<b>0,94340</b>	<b>0,016416</b>
Substrato (L)	0,41225	0,143771
Substrato (Q)	0,30706	0,253587
EFA (L)	-0,45446	0,118549
EFA (Q)	0,47713	0,116313
Agitação (L)	<b>-1,04389</b>	<b>0,015541</b>
Agitação (Q)	0,67554	0,053298
Substrato (L) x EFA (L)	<b>-1,83167</b>	<b>0,006800</b>
Substrato (L) x Agitação (L)	-0,49833	0,166109
EFA (L) x Agitação (L)	0,59167	0,119308

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022).

## APÊNDICE H – ANOVA PARA O RENDIMENTO EM LASIODIPLODANA EM MEIO MSAC

Tabela 17 - ANOVA e efeitos principais estimados para o rendimento em lasiodiplodana em meio MSAC

Termos	SQ	GL	MQ	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Tab</sub>
<b>Modelo</b>	0,067646	9	0,007516	46,28	9.01
<b>Resíduo</b>	0,056044	8	0,007006	-	-
<b>Total</b>	0,123691	17	-	-	-
<b>R<sup>2</sup></b>			0,5469		

Variáveis	Efeito	p-valor
Média/interseção	0,033882	0,440880
Substrato (L)	-0,074224	0,140086
Substrato (Q)	0,037309	0,451482
EFA (L)	-0,025370	0,590919
EFA (Q)	0,039985	0,420942
Agitação (L)	-0,074371	0,139402
Agitação (Q)	0,040185	0,418721
Substrato (L) x EFA (L)	-0,057025	0,363504
Substrato (L) x Agitação (L)	0,065678	0,299358
EFA (L) x Agitação (L)	0,034648	0,574403

SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; F<sub>Calc</sub>: F calculado; F<sub>Tab</sub>: F tabelado; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; Valores em negrito são estatisticamente significativos.

Fonte: Autoria própria (2022).