

# **PRODUÇÃO DE BIOADITIVOS**



# BIOPROCESSOS NA PRODUÇÃO DE ADITIVOS ALIMENTARES

Cristine Rodrigues  
Juliana de Oliveira  
Mario César Jucoski Bier  
Suzan Cristina Rossi  
Julio César de Carvalho  
Luciana Porto de Souza Vandenberghe  
Michele Rigon Spier  
Adriane Bianchi Pedroni Medeiros  
Carlos Ricardo Soccol

## 7.1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos e bebidas, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente sem o propósito de incrementar o valor nutritivo desses produtos. O objetivo de um aditivo é modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de alimentos ou bebidas. Ao agregar-se, poderá resultar que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente desse alimento ou bebida. Essa definição não inclui

os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais<sup>1-5</sup>.

O mercado mundial de aditivos vem sendo dominado majoritariamente pelas classes de aditivos aromatizantes e flavorizantes, melhoradores de sabor, espessantes e hidrocoloides, acidulantes e emulsificantes. Estima-se que esse mercado poderá atingir 33,9 bilhões de dólares em 2015 e 37,7 bilhões de dólares em 2018, conforme projeções da empresa Global Information Inc. 2012<sup>4</sup>, sendo que os pigmentos naturais passarão de 10% para mais de 30% de participação. A mesma tendência é vista no uso de aromas, estabilizantes e acidulantes. No Brasil, a indústria de aditivos também tem crescido intensamente. A produção nacional apresentou um aumento de aproximadamente 80% nos últimos cinco anos.

O aumento da inclusão de aditivos em diferentes produtos, tais como bebidas, ração animal, produtos farmacêuticos, cosméticos e outros, acompanhou o crescimento da população e a demanda de consumo. A necessidade de conservação desses produtos e a melhora de sua qualidade sensorial, além de outros atributos que atraíam a atenção dos consumidores, traz uma crescente demanda pelo uso e aplicação de aditivos<sup>6</sup>. Entretanto, a crescente utilização de aditivos químicos preocupa órgãos ligados à saúde pública e toda a população, devido aos riscos de sua utilização relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças, tais como alguns tipos de câncer, lesões neurológicas, intoxicações, processos alergênicos e hiperatividade. Sendo assim, alguns fatores diretos ou indiretos que explicam o crescimento do mercado de bioaditivos estão relacionados à segurança alimentar, saúde e nutrição, especialmente à necessidade do controle de doenças tais como diabetes, obesidade e alergias alimentares. Outros fatores são a necessidade emergencial de agregar valor aos produtos, maior procura por conveniência e praticidade, a demanda de fornecimento contínuo de matérias-primas e menores custos com energia.

A busca crescente por novos produtos aditivos acarreta uma necessidade de se realizar investimentos significativos em pesquisas e desenvolvimento, além da necessidade de aprovações em processos regulatórios<sup>4</sup>.

A avaliação do risco associado ao consumo de aditivos alimentares é realizada pelo Comitê de Especialistas da FAO/OMS\* em Aditivos Alimentares (em inglês, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA) desde 1956, além de assessorar o Codex Alimentarius, órgão conjunto da FAO/OMS, em suas decisões. Já no Brasil, é a Agência Nacional de Vigilância

\* Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS).

Sanitária (ANVISA), um órgão público, que controla e fiscaliza os aditivos alimentares, bem como os coadjuvantes de tecnologia de fabricação<sup>7</sup>. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 27/2010<sup>8</sup>, os aditivos inscritos na Farmacopeia Brasileira e aqueles utilizados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) estão dispensados da obrigatoriedade de registro na ANVISA.

## 7.2 HISTÓRICO

A adição de produtos químicos aos alimentos para sua conservação é um processo que tem sido utilizado há séculos. Fumaça, álcool, vinagre, óleo e condimentos são usados há mais de 10 mil anos para preservar alimentos. Após a Revolução Industrial, com o melhor entendimento sobre alimentos e o aumento da demanda em quantidade e qualidade, houve uma oferta na variedade de compostos químicos utilizados para a preservação de alimentos e manutenção de sua cor, sabor e textura<sup>9,10</sup>.

No início dos anos 1900, o dr. Harvey Wiley, químico chefe do Departamento de Agricultura norte-americano, formou um grupo apelidado de Poison Squad, cujo objetivo foi estabelecer se tais compostos eram prejudiciais à saúde. O documento produzido pelo grupo citava que eram proibidos a fabricação, transporte e comércio interestadual de alimentos adulterados ou mal rotulados<sup>10</sup>.

Com o desenvolvimento da tecnologia e crescimento da demanda da população, a produção de aditivos utilizados em alimentos aumentou significativamente a partir dos anos 1950. Na década de 1960, mais de 2.500 diferentes compostos químicos já eram utilizados em alimentos. Em 1962, com o objetivo de desenvolver padrões para alimentos em caráter internacional, foi criada a Comissão do Código Alimentar (Codex Alimentarius Commission). A demanda por novos compostos vem aumentando continuamente, desde então, até os dias de hoje<sup>10,11</sup>.

## 7.3 ACIDULANTES

Acidulante pode ser definido – segundo a Portaria n° 540, de 27 de outubro de 1997, da ANVISA – como toda substância que aumenta a acidez ou confere um sabor ácido aos alimentos.

Os acidulantes possuem várias funções na indústria de alimentos, tais como conferir um sabor ácido ou “agridoce”, influenciar na textura dos alimentos, conservar alimentos, atuar como agente sequestrante e melhorar a digestibilidade<sup>12</sup>.

As substâncias utilizadas como acidulantes, de acordo com a legislação brasileira (RDC nº 45, de 3 de novembro de 2010), são o ácido cítrico, o ácido fumárico, o ácido lático, o ácido málico, o ácido tartárico e o glucono delta lactona. Essas substâncias podem ser encontradas *in natura* ou podem ser obtidas através de processos de fermentação ou síntese química. Pelo processo de fermentação são obtidos os ácidos cítrico, lático, acético e o fumarato de sódio (ácido fumárico).

### 7.3.1 Ácido cítrico

O ácido cítrico, 2-hidróxido-propano-1,2,3-ácidotricarboxílico ( $C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$ ), é um composto intermediário do ciclo do ácido cítrico, está presente em sucos de frutas cítricas e abacaxi. Apresenta-se na forma de cristais, possui sabor ácido, não possui odor e é levemente higroscópico<sup>13</sup>.

O ácido cítrico pode ser obtido através do processo de fermentação utilizando fungos filamentosos, leveduras e bactérias. O fungo *Aspergillus niger* é o micro-organismo utilizado para a produção industrial do ácido cítrico. Outras espécies de *Aspergillus*, tais como *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus wenti* e *Aspergillus foetidus*, e leveduras como *Saccharomyces lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida oleophila*, *Candida guilliermondi*, *Candida parapsilosis* e *C. citroformans* apresentam boas perspectivas de produção de ácido cítrico. Bactérias também foram estudadas; entretanto, dentre os micro-organismos, o *A. niger* apresenta-se como a melhor escolha para sua produção<sup>13</sup>. Na Tabela 7.1 é possível observar a produção de ácido cítrico obtida com diferentes substratos e micro-organismos.

Tabela 7.1 Produção de ácido cítrico por fermentação

SUBSTRATO/SUORTE	MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
Polpa Cítrica	<i>A. niger</i>	FES	492,7 g/kg	14
Casca de café	<i>A. niger</i>	FES	187,54 g/kg	15

SUBSTRATO/SUPOORTE	MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
Cochos de frutos vazios de palma (de óleo)	<i>A. niger</i> IBO – 103MNB	FES	337,94 g/kg	16
Turfa	<i>A. niger</i> NRRL 567	FES	354,8 g/kg	17
Amido de batata	<i>A. niger</i> GCB-47	FESS	44,2 g/L	18
	<i>A. niger</i> GCMC-7		71,4 g/L	

**Legenda:** FES, fermentação no estado sólido; FESS, fermentação no estado semissólido.

O processo de produção do ácido cítrico ocorre normalmente por meio do uso da técnica de fermentação submersa e fermentação no estado sólido, em operação contínua e multiestágio<sup>13</sup>. A recuperação do ácido cítrico do caldo fermentado e sua purificação podem ser realizadas por duas principais maneiras: pela conversão do ácido cítrico em citrato de cálcio e posterior precipitação e pela técnica de extração líquido-líquido.

### 7.3.2 Ácido acético

O ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) é um ácido fraco, transparente e com odor característico. É muito utilizado na indústria química, de detergentes, madeira e alimentícia. O ácido acético pode ser obtido pela síntese química (carboxilação do metanol, oxidação do etileno e oxidação de alcanos) e pela conversão biológica do etanol. Apesar de o processo biológico para obtenção do ácido acético representar em torno de 10% do mercado mundial, em muitos países o ácido acético de grau alimentício deve ser produzido por processo biológico (fermentação)<sup>19</sup>.

A oxidação de etanol, o qual está presente em baixa quantidade no meio de cultivo, em ácido acético é realizada por uma cultura mista de bactérias acéticas, preferencialmente bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Várias espécies de bactérias são descritas para a produção de ácido acético, tais como *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A. orleanensis*, *A. lovaniensis*, *A. estunensis*, *A. malorum*, *A. cerevisiae*, *A. oeni*, *G. xylinus*, *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens*, *G. intermedius* e *G. Entanii*<sup>20-22</sup>. Algumas produções de ácido acético por fermentação podem ser visualizadas na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 Produção de ácido acético por fermentação em meio sintético

MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Acetobacter pasteurianus</i>	Em duas etapas: crescimento de <i>S. cerevisiae</i> e produção de etanol, e cocultura de <i>S. cerevisiae</i> e <i>A. pasteurianus</i>	66,0 g/L	23
<i>Acetobacter aceti</i>	F <sub>Sm</sub>	53 g/L em frascos de Erlenmeyer 76 g/L em biorreator de tanque agitado	19
<i>Acetobacter aceti</i> 2096	Batelada alimentada repetida	90 g/L	24

Legenda: F<sub>Sm</sub>, fermentação submersa.

A otimização do processo biológico para a produção de ácido acético tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisas que utilizam células livres ou imobilizadas<sup>19</sup>. Wang et al. (2013)<sup>23</sup> estudaram um sistema de cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Acetobacter pasteurianus*. No entanto, para esse tipo de cultura existe a dificuldade de os vários micro-organismos presentes possuírem diferentes condições ótimas, tais como pH, temperatura, substrato e concentrações de oxigênio.

### 7.3.3 Ácido láctico

O ácido láctico ( $\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$ ) é um ácido orgânico de ocorrência natural. Sua aplicação é versátil e ele pode ser empregado na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, de couro e química<sup>25</sup>.

O ácido láctico pode ser obtido pela síntese química e por processo fermentativo. Pela rota de síntese química, uma mistura racêmica de DL-ácido láctico é produzida. Entretanto, a fermentação do ácido láctico produz o isômero puro D ou L-ácido láctico de acordo com o micro-organismo selecionado. A produção do ácido láctico pela fermentação possui outras vantagens, tais como: a utilização de substratos com baixo custo, baixas temperaturas de produção e baixo consumo de energia<sup>26-28</sup>.

O ácido láctico pode ser produzido por diversos micro-organismos, tais como bactérias, fungos filamentosos, leveduras, cianobactérias e algas. As bactérias acidoláticas são os micro-organismos mais estudados. Essas bactérias possuem características desejáveis de um micro-organismo industrial,

como habilidade de fermentar rapidamente e completamente substratos de baixo custo, requerer mínima quantidade de nitrogênio e substâncias, além de propiciar altos rendimentos de um isômero específico de ácido lático sob condições de baixo pH e altas temperaturas<sup>29</sup>. A produção de ácido lático utilizando diferentes micro-organismos e diferentes substratos pode ser visualizada na Tabela 7.3.

**Tabela 7.3** Produção de ácido lático por fermentação

SUBSTRATO/SUORTE	MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
Glicose	<i>Lactobacillus paracasei</i>	FSm em biorreator a 38 °C	192 g/L, 96,6% do isômero L	30
Vinhaça de soja/ melaço de soja	<i>Lactobacillus agilis</i>	FSm em biorreator	138 g/L	31
Bagaço de mandioca	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Sacarificação e fermentação simultâneas	175,4 g/L	32
Lodo de papel	<i>Bacillus coagulans</i>	Sacarificação e fermentação simultâneas semicontínuas	92,0 g/L	33
Melaço	<i>Lactobacillus delbrueckii mutant Uc-3</i>	FSm	166 g/L	34

Legenda: FSm, fermentação submersa.

### 7.3.4 Ácido fumárico

O fumarato de sódio é obtido do ácido fumárico, sendo uma molécula de quatro carbonos que contém dois grupos carboxílicos e uma dupla ligação<sup>35</sup>. A produção atual é feita por síntese química do anidrido maleico, o qual provém do butano. Entretanto, com o aumento do preço do petróleo, processos fermentativos para obtenção do ácido fumárico têm recebido maior atenção<sup>36,37</sup>.

Os micro-organismos que são os melhores produtores de ácido fumárico são os do gênero *Rhizopus*<sup>36,37</sup>. Alguns micro-organismos produtores de ácido fumárico, assim como a produção desse ácido, estão apresentados na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 Produção de ácido fumárico por fermentação em meio sintético

MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Rhizopus arrhizus</i> RH-07-13	F5m com células imobilizadas	32,03 g/L	37
<i>Rhizopus oryzae</i> FM19	F5m	56,50 g/L	38
<i>Rhizopus oryzae</i> Wild1.22 (mutante)	F5m	49,40 g/L	39
<i>Rhizopus delemar</i> NRRL1526	F5m em biorreator tipo tanque agitado	35,42 g/L	40
<i>Rhizopus oryzae</i> ME-F12 mutante	F5m em biorreator tipo tanque agitado	42,50 g/L	41

Legenda: F5m, fermentação submersa.

O mecanismo de biossíntese do ácido fumárico, apesar de muito estudado, ainda não foi totalmente elucidado, o que tem sido um gargalo para o melhoramento do processo de produção e sua industrialização. Dessa forma, muita atenção tem sido dada à investigação sobre a produção, condições de cultivo e sua influência no rendimento de ácido fumárico<sup>38</sup>.

## 7.4 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes desempenham uma função vital tanto nos alimentos quanto na saúde humana reduzindo os processos oxidativos. Em sistemas alimentares, os antioxidantes são úteis no retardamento da peroxidação lipídica e na formação de produtos de peroxidação secundária de lipídios, e, assim, ajudam a manter o sabor, aroma, textura, e, em alguns casos, a cor do alimento durante o armazenamento<sup>42</sup>.

De acordo com DeMan (1999)<sup>43</sup> algumas vezes os antioxidantes são incorporados na embalagem dos alimentos, e não no alimento em si. Nesses casos, é permitida uma quantidade maior de antioxidantes.

Antioxidantes alimentares são todas as substâncias que possuem o efeito de retardar ou prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos. Os antioxidantes são um grupo heterogêneo e diversificado de compostos com diferentes mecanismos de ação. Dentre os mais conhecidos estão vitaminas, minerais, pigmentos, enzimas e diferentes compostos vegetais.

### 7.4.1 Classes de antioxidantes

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. O mais amplamente utilizado é a vitamina C e substâncias relacionadas, como o ácido eritórbito. Dentre os agentes quelantes, o mais utilizado é o ácido cítrico. Tais agentes quelantes removem íons metálicos, que são poderosos agentes oxidativos.

Os antioxidantes primários finalizam os radicais livres, funcionando como doadores de elétrons. Dentre esses antioxidantes estão inclusos os tocoferóis, os antioxidantes fenólicos e também os antioxidantes sintéticos hidroxitolueno butilato (BHT) e hidroxianisol butilato (BHA). Os antioxidantes enzimáticos como a glicose oxidase possuem a capacidade de remover oxigênio dissolvido ou no *headspace*. Dentre os antioxidantes sinergistas destacam-se as lecitinas. Os antioxidantes sinergistas possuem pouca ou nenhuma atividade antioxidativa, porém possuem a capacidade de aprimorar a atividade de outros antioxidantes.

#### 7.4.1.1 Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido L-ascórbico foi produzido industrialmente há cerca de 70 anos. Nas últimas duas décadas, vários sistemas inovadores de bioconversão foram propostos a fim de simplificar o método de síntese química chamado método de Reichstein<sup>44</sup>. Embora os processos biotecnológicos já sejam explorados para a produção de vitamina C, o método químico ainda é o mais utilizado. Sauer et al. (2004)<sup>45</sup> produziram vitamina C com *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* por fermentação submersa. De acordo com Bremus et al. (2005)<sup>44</sup> uma crescente demanda e competição em todo o mundo são a força motriz para o desenvolvimento de métodos alternativos de produção de ácido L-ascórbico<sup>44</sup>.

O ácido L-ascórbico é produzido industrialmente a partir de glicose. O açúcar é primeiramente reduzido a sorbitol e então oxidado a L-sorbose pelo *Acetobacter suboxydans*, posteriormente resultando em um composto chamado ácido 2-ceto-gulônico. Este é oxidado a um derivado do ácido 2-L-oxogulônico. Após a remoção dos grupos isopropilidênicos, o ácido L-ascórbico é obtido tendo o ácido oxogulônico como intermediário. Essa síntese pode ser encurtada e ter seus custos reduzidos com a utilização de

uma bactéria geneticamente modificada de *Erwinia herbícola*, a qual converte diretamente a D-glicose em ácido L-oxogulônico<sup>46</sup>.

Diante da necessidade de preservar a vitamina C como componente de alimentos, o D isômero do ácido isoascórbico (ácido eritórbico) é incorporado ao ácido ascórbico. Esse composto não possui propriedades de vitamina, porém é oxidado mais rapidamente do que o ácido ascórbico, protegendo-o da degradação. O ácido eritórbico pode ser sintetizado quimicamente, ou sintetizado por fermentação da sacarose por *Penicillium* ou da glicose por *Pseudomonas* seguido por reações de esterificação.

#### **7.4.1.2 Tocoferol (Vitamina E)**

Vitamina E é o nome popular para todos os compostos que apresentam atividade biológica do  $\alpha$ -tocoferol. De acordo com Branen (2002)<sup>47</sup>, tocoferóis são os antioxidantes de quebra de cadeia mais ativos. A principal fonte desses compostos são os vegetais; sendo assim, ocorrem na maioria dos alimentos, a menos que sejam removidos por meio de processos específicos durante a fabricação.

A maior parte dos tocoferóis comerciais é obtida por extração vegetal. De acordo com o Institute of Medicine (2000)<sup>48</sup>, as vitaminas obtidas por vias sintéticas são geralmente idênticas às naturais e possuem as mesmas funções, porém essa relação não é verdadeira para a vitamina E, devido às suas diferentes configurações moleculares, afetando seu funcionamento.

Diversos estudos reportam a produção de tocoferóis por vias fermentativas, principalmente  $\alpha$ -tocoferol. Ogbonna, Tomiyama e Tanaka (1999)<sup>49</sup> obtiveram produção de  $\alpha$ -tocoferol através da alga verde *Euglena gracilis* em um processo com alimentação heterotrófica e fotoautotrófica. Durmaz (2007)<sup>50</sup> estudou o acúmulo do composto a partir da alga marinha *Nannochloropsis oculata*, limitando o nitrogênio.

#### **7.4.1.3 Lecitinas**

As lecitinas são indiscutivelmente os mais difundidos dos fosfolipídios na natureza e estão contidos em praticamente todas as células vivas. Estão presentes em muitos produtos alimentares, tais como gema de ovo, vários tipos diferentes de chocolate e, principalmente, em farinha de soja<sup>51</sup>. Em sua

composição as lecitinas possuem fosfolipídios, glicolipídios e carboidratos complexos.

As lecitinas trazem grandes benefícios à saúde e têm importantes aplicações industriais como agente emulsionante comestível, antioxidante, agente dispersante, estabilizante, desmoldante, umectante e inibidor de cristalização. Apesar de não existirem trabalhos buscando a produção biotecnológica de lecitina, a hidrólise enzimática e microbiana é utilizada para melhorá-la ou modificar seus fosfolipídios<sup>52-54</sup>.

#### **7.4.1.4 Flavonoides**

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres. Os compostos fenólicos mais estudados e já produzidos por via biotecnológica são ácido cafeico<sup>55</sup>, ácido gálico<sup>56</sup> e ácido elágico<sup>57</sup>. Esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica<sup>58</sup>.

### **7.5 AROMAS**

Segundo a International Organization of Flavor Industry (IOFI)<sup>59</sup>, aromatizante é uma preparação concentrada, adicionada ou não de solventes ou veículos, utilizada para transmitir sabor, com exceção do sabor somente doce, azedo ou salgado. Já a ANVISA define aromatizantes como substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos. Excluem-se dessa definição os produtos que conferem exclusivamente sabor doce, salgado ou ácido e as substâncias alimentícias ou produtos normalmente consumidos como tal, com ou sem reconstituição, conforme a Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999<sup>60</sup>.

Os aromatizantes são aditivos tão importantes quanto os macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos) e micronutrientes (vitaminas e minerais), podendo ser considerados como componentes essenciais para a alimentação humana e animal, já que conferem odor e sabor agradável aos alimentos industrializados.

Os aromatizantes/aromas classificam-se em naturais ou sintéticos. Sendo que os naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas de origem animal ou vegetal, normalmente utilizadas na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamento enzimático etc.). Incluem-se nos aromatizantes ou aromas naturais os óleos essenciais e extratos (líquidos ou secos). Os aromatizantes ou aromas sintéticos são compostos obtidos por processos químicos. Os aromas idênticos aos naturais são substâncias quimicamente obtidas por síntese ou substâncias isoladas por processos químicos a partir de matérias-primas de origem animal ou vegetal, que apresentam uma estrutura química idêntica à das substâncias presentes nas referidas matérias-primas naturais (processadas ou não). Os aromas artificiais são compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal ou vegetal, utilizados por suas propriedades aromáticas, em seu estado primário ou preparados para o consumo humano.

A indústria de alimentos e bebidas tem utilizado combinações de ésteres, como acetato de etila, acetato de isoamila, isobutirato de etila, acetato de propila e outros, para intensificar aromas em sorvetes, doces, sucos artificiais e néctares de frutas, e até mesmo fornecer sabor suave a “*drinks*” industrializados. Já a indústria farmacêutica tem utilizado esses compostos de aroma para mascarar sabor desagradável de medicamentos. O caráter hidrofóbico desses compostos dificulta sua incorporação; nesse sentido, novas formulações têm sido propostas para facilitar o uso de ésteres em alimentos. Edris e Malone (2011)<sup>61</sup> desenvolveram uma formulação de éster (aroma de banana) a base de água por microemulsão para aromatizar aplicações que utilizam laurato de sacarose como surfactante. Kim et al. (2014)<sup>62</sup> testaram cinco compostos voláteis com diferentes hidrofobicidades e grupos funcionais (benzaldeído, citral, mentol, diacetil e acetato de isoamila) para medir sua liberação em gel de pectina, sendo que géis com alto teor de cálcio e pectina reduziram a intensidade percebida dos aromas, bem como sua liberação.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA), o faturamento do setor de alimentos em 2012 foi de 431,9 bilhões de reais<sup>63</sup>. O mercado de aromas corresponde a 25% do mercado de aditivos para alimentos. Devido à grande evolução no mercado de alimentos processados industrializados, aumentou a utilização de compostos de origem natural, os quais são mais valorizados quando se refere à saúde humana. O aumento na demanda por produtos naturais tem estimulado as pesquisas

e o desenvolvimento de aromas produzidos tanto por fermentação quanto por reação enzimática. Os estudos relatam o desenvolvimento de aromas de aplicação em bebidas como vinhos, cafés, qualidade de queijos entre outros alimentos. Segundo Mantzouridou e Paraskevopoulou (2012)<sup>65</sup>, os compostos aromatizantes mais importantes são os ésteres voláteis, que, quando em misturas ou separadamente, conferem odor frutal aos alimentos e bebidas. A Tabela 7.5 apresenta alguns estudos desenvolvidos na produção de aromas naturais por via biotecnológica.

Tabela 7.5 Estudos recentes envolvendo aromas naturais produzidos por via biotecnológica

SUBSTRATO	BIOPROCESSO	ENZIMA	MICRO-ORGANISMO	PRODUTOS	REFERÊNCIA
Mosto de uvas de <i>Vitis vinifera</i> cv	Influência de fungicidas na síntese de aromas no processo de produção do vinho Tempranillo	Álcool acetiltransferase e acetil-CoA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Redução do aroma frontal no vinho	66
Mosto de uvas de <i>Vitis vinifera</i>	Síntese enzimática favorecendo aroma do vinho	Poligalacturonase	<i>Pichia pastoris</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	$\alpha$ -pineno, limoleno, eugenol, citrionelol, terpineol	67
Soja	Estudo dos aromas produzidos durante fermentação		<i>R. oligosporus</i> , NRRL 2710	Tempeh	68
Leite de coco	Síntese enzimática de ésteres de açúcares e sua estabilidade em emulsão de leite de coco	Lipase imobilizada	<i>Candida antarctica</i> tipo B	Ésteres de sacarose, frutose e lactose	69

Rossi et al. (2009)<sup>64</sup>, otimizaram a produção de aroma natural por fermentação no estado sólido pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* utilizando a polpa cítrica, subproduto da agroindústria, como substrato. As melhores condições para obtenção do aroma foram: a complementação da polpa cítrica com 50% de farelo de soja, 25% melaço de cana e solução salina, sendo pH ideal 6,0, umidade inicial de 75%, taxa de inóculo de  $10^7$  esporos/g de substrato. Os compostos de aromas produzidos durante 120 horas de fermentação foram acetaldeído, etanol, acetato de etila, acetato de propila, isobutirato de etila, 2-hexanona, 2-hexanol e o de maior impacto no aroma global de banana, acetato de isoamila. Cvjetko, Vorkapic-Furac e Znidarsic-Plazl (2012)<sup>70</sup>, desenvolveram a biosíntese de acetato de isoamila utilizando a enzima lipase imobilizada de *Candida antarctica* B, esta catalizou

a reação de acilação de álcool isoamílico e anidrido acético em líquidos iônicos baseados em cátions imidazólicos quaternários de cátions.

## 7.6 CONSERVANTES

O uso de conservantes é necessário em alimentos que não podem ser submetidos a processos físicos e/ou biológicos de conservação de forma a preservá-los. Os conservantes químicos são de especial importância em países tropicais, onde a deterioração de alguns alimentos é acentuada pelo grau de umidade e temperaturas próximas ao ótimo do desenvolvimento microbiano<sup>71</sup>.

De acordo com o Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965, conservante é toda substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas. A ação antimicrobiana dos conservantes baseia-se em efeitos sobre um ou mais componentes/atividades, tais como: ácido desoxirribonucleico (DNA), membrana plasmática, parede celular, síntese proteica, atividade enzimática e transporte de nutrientes. A escolha adequada de um conservante deve ser feita com base em alguns fatores, tais como o tipo de micro-organismo a ser inibido, facilidade de manuseio, impacto no paladar, custo e eficácia<sup>71</sup>.

### 7.6.1 Ácido propiônico

O principal conservante produzido por via biotecnológica é o ácido propiônico. A produção de ácido propiônico por fermentação, como uma alternativa para a síntese química, utiliza *Propionibacteria* usualmente. Esses micro-organismos são capazes de crescer e produzir ácido propiônico utilizando como substrato um número extenso de subprodutos agrícolas e industriais<sup>72</sup>. A Tabela 7.6 apresenta alguns trabalhos nesse sentido.

Tabela 7.6 Produção de ácido propiônico por fermentação

MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Fermentação em <i>shaker</i> em condição de anaerobiose	14,38 g/L	73
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Biorreator de adsorção em leito expandido	52,5 g/L	74
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Fermentação sequencial	50,8 g/L	72

## 7.7 CORANTES E PIGMENTOS

A indústria alimentícia e farmacêutica utiliza corantes na maioria de seus produtos. A cor é em geral a primeira característica organoléptica notada em um objeto, sendo uma percepção sensorial muito forte, antecedendo a percepção de odor e de textura do produto.

O uso de corantes naturais é regulamentado por agências como a ANVISA (no Brasil), a Food and Drug Administration (FDA, nos Estados Unidos) e sugerida pelo Codex Alimentarius (Organização das Nações Unidas – ONU). Embora o uso de corantes às vezes seja abusivo, há diversas razões técnicas e justificáveis para seu emprego, por exemplo, a padronização de lotes diferentes de um produto, a “reposição” de cor perdida durante processamento, a melhoria de aspecto de um produto<sup>75,76</sup> etc.

A rigor, na indústria, substâncias com cor que são solúveis são chamadas corantes, enquanto as insolúveis são chamadas de pigmentos. No entanto, as substâncias coloridas produzidas por plantas são chamadas em biologia de pigmentos, e esse termo acabou sendo mais usado na pesquisa internacional de corantes naturais produzidos por bioprocessos – daí o termo “biopigmentos”.

Os pigmentos produzidos por micro-organismos e utilizados comercialmente são a riboflavina, pigmentos de *Monascus*, carotenoides, astaxantina e ficocianina, principalmente em países orientais. Esses pigmentos representam cerca de 25% do mercado global de pigmentos naturais<sup>77</sup>, que é estimado em mais de 600 milhões de dólares e continua em crescimento<sup>78</sup>. Há um incremento constante do mercado global para pigmentos, devido tanto à expansão moderada da economia quanto ao aumento populacional. Projeta-se um mercado global de pigmentos naturais de mais de 1,5 bilhões de dólares para 2020<sup>77</sup>, incluindo os corantes extraídos de vegetais e biomassas coloridas usadas na alimentação de peixes e aves.

### 7.7.1 Produção por micro-organismos

Biopigmentos podem ser acumulados intracelularmente ou ser excretados, dependendo da função da molécula no micro-organismo. A Tabela 7.7 mostra alguns micro-organismos produtores de pigmentos mais importantes comercialmente.

Tabela 7.7 Pigmentos microbianos cuja produção existe em escala comercial

MICRO-ORGANISMO	PIGMENTO	COR	CONCENTRAÇÃO TÍPICA	REFERÊNCIA
<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -caroteno	Vermelho-alaranjado	14 mg/g	79
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina	Salmão	0,35 mg/g	80
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -caroteno	Vermelho-alaranjado	40-170 mg/g biomassa, em FSm	81, 82
<i>Monascus sp.</i>	Mistura de azafilonas	Vermelha, laranja, amarelo	0,3-2,5 mg/g substrato, em FES	83, 84
Diversas microalgas, como <i>Chlorella</i> e <i>Spirulina</i>	Clorofila	Verde	11,6 mg/g	85

Legenda: FES, fermentação no estado sólido. FSm, fermentação submersa

Quando se trabalha com pigmentos produzidos em biorreatores, através do cultivo de micro-organismos ou células, a produtividade é potencialmente muito maior que aquela obtida em produção vegetal, principalmente devido ao baixo tempo de duplicação de micro-organismos e à facilidade de processamento do material bruto<sup>86</sup>. Além do ciclo de produção ser mais curto, a concentração em micro-organismos é geralmente mais alta que em plantas. Por exemplo, para a produção de  $\beta$ -caroteno, podem-se usar cenouras; com um ciclo de produção de 100 dias e uma concentração final de 70 mg/kg do carotenoide; agrião, com um ciclo de produção de cerca de 60 dias e uma concentração de 60 mg/kg de carotenoide; ou um fungo, com ciclo de produção de 5 dias e concentração final de 250 mg/kg de carotenoide<sup>77</sup>.

A produção de biopigmentos intracelulares consiste no cultivo do micro-organismo em meio de cultivo adequado, seguido de separação de biomassa. Os meios de cultivo para cada espécie são abundantes na literatura; como as moléculas de interesse não são metabólitos primários, em geral convém usar um meio de cultivo adequado para a produção de biomassa, seguido de uma etapa de indução da produção de pigmentos. A biomassa pode ser separada por filtração ou centrifugação, e o produto pode ser a própria biomassa (caso em que é feita apenas a secagem e moagem do material); caso o pigmento seja intracelular ou se deseje uma formulação concentrada, o pigmento pode ser extraído e parcialmente purificado antes da formulação (Figura 7.1). Não é usualmente necessário purificar o pigmento para além de uma adsorção e filtração de precipitados.

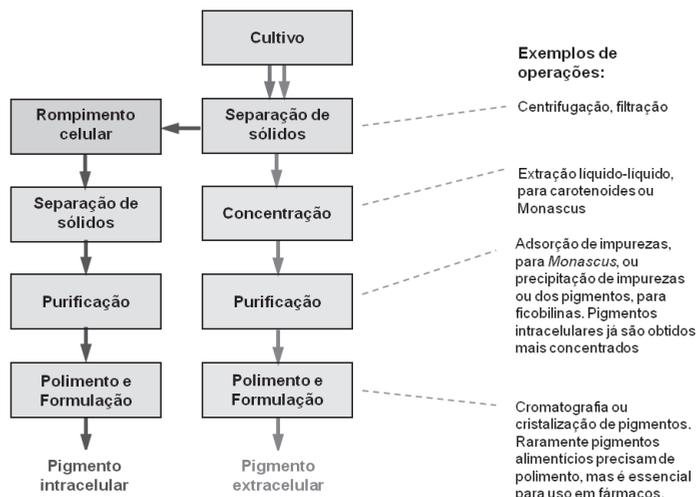


Figura 7.1 Processos envolvidos em produção de pigmentos microbianos.

## 7.7.2 Formulação e aplicação

Para serem usados em alimentos, pigmentos naturais podem ser adicionados como ingrediente (como biomassa concentrada ou parcialmente purificada, por exemplo) ou como aditivos. Nesse segundo caso, a formulação do pigmento como uma dispersão solúvel pode ser necessária. As formulações típicas de corantes são hidrossolúveis ou lipossolúveis; a forma de preparar uma dessas formulações dependerá da estrutura química do pigmento.

No caso de pigmentos lipossolúveis como carotenoides, a formulação lipossolúvel é uma simples solução (em óleo), enquanto a hidrossolúvel pode ser uma emulsão óleo-água e exige, portanto, a adição de um estabilizante como lecitina. No caso de um pigmento hidrossolúvel como a clorofilina cúprica, a sua formulação lipossolúvel é que precisa de emulsificante, enquanto a formulação hidrossolúvel é uma solução aquosa. A quantidade de pigmentos naturais permitida em alimentos é, de forma geral, *ad quantum satis*, de acordo com as boas práticas de fabricação de alimentos.

A legislação restringe o uso de novos pigmentos, a não ser que sejam moléculas derivadas de micro-organismos genericamente reconhecidos como seguros (GRAS). Portanto é necessário realizar testes toxicológicos com o micro-organismo e com a molécula, a fim de avaliar a segurança de uso do pigmento. Além das estratégias tradicionais de produção, o uso de

micro-organismos modificados que expressem pigmentos já conhecidos de plantas deve ser uma fonte de novos produtos nos próximos anos<sup>77</sup>.

## 7.8 ESPESSANTES

As substâncias químicas que são capazes de aumentar nos alimentos a viscosidade de soluções, de emulsões e de suspensões são conhecidas como espessantes. São utilizadas para dispersar, estabilizar ou evitar a sedimentação de substâncias em suspensão<sup>87</sup>.

### 7.8.1 Goma xantana

A goma xantana é o biopolímero mais conhecido e estudado. Composto por glicose, é produzido comercialmente por fermentação. É um heteropolissacarídeo secretado por bactérias do gênero *Xanthomonas* (Tabela 7.8). Possui elevado interesse industrial, principalmente para as indústrias de alimentos, farmacêutica e de petróleo devido às suas propriedades físico-químicas, que superam todas as dos outros polissacarídeos disponíveis no mercado, tais como elevada viscosidade em baixas concentrações, bem como sua estabilidade em ampla faixa de temperatura e de pH, mesmo na presença de sais<sup>88,89</sup>.

Tabela 7.8 Produção de goma xantana

SUBSTRATO/ SUPORTE	MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
Melaço de beterraba	<i>Xanthomonas campestris</i>	F5m e cepa mutante	28 g/L	90
Produtos do suco da palma	<i>Xanthomonas campestris</i> NRRL B-1459	F5m	43,35 g/L	91
Soro de queijo e sacarose	<i>Xanthomonas campestris</i>	F5m	25 g/L	92

Legenda: F5m, fermentação submersa.

Vários fatores afetam a produção de goma xantana, obtendo-se assim uma variação nos rendimentos e na qualidade do polímero. As variáveis que influenciam na produção são a composição do meio de cultivo, da linhagem

e das condições de fermentação utilizadas (temperatura, pH, velocidade de agitação, concentração inicial de nitrogênio)<sup>93</sup>.

### 7.8.2 Goma gelana

A goma gelana é um polissacarídeo extracelular composto por glicose, ácido glicurônico e resíduos de ramnoses. Devido à sua estrutura e propriedades, a goma gelana possui aplicações em alimentos, indústria farmacêutica e outras indústrias. A goma gelana é produzida por fermentação por *Sphingomonas paucimobilis*<sup>94-96</sup>. Diferentes produções de goma gelana são listadas na Tabela 7.9.

Tabela 7.9 Produções de goma gelana

SUBSTRATO/ SUPORTE	MICRO-ORGANISMO	ESTRATÉGIA	PRODUÇÃO	REFERÊNCIA
Amido solúvel	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461	FSm	43,6 g/L	95
Bagaço de soja	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> NK 2000	FSm em Biorreator de 7 L	7,5 g/L	94
Amido solúvel	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461	FSm	35,7 g/L	96

Legenda: FSm, fermentação submersa.

### 7.8.3 Goma curdlana

A goma curdlana, um polímero de glicose com ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3), é um polissacarídeo neutro, insolúvel em água e de cadeia linear. Este biopolímero é um espessante com propriedades de gelificação térmica diferenciadas e é amplamente utilizado na indústria alimentar, possuindo aplicações farmacêuticas<sup>97,98</sup>.

Esse polissacarídeo é produzido industrialmente por fermentação e, em quantidade, perde somente das gomas xantana e gelana. Pode ser produzido por bactérias como *Rhizobium radiobacter*, espécies de *Agrobacterium* e *Alcaligenes faecalis* sob condição de nitrogênio limitado<sup>97,98</sup>. Salah et al. (2011)<sup>97</sup> produziram curdlana utilizando hidrolisado de palma e a bactéria *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466, sendo que a concentração de curdlana

obtida foi de 22,83 g/L. Um estudo sobre o efeito da fonte de nitrogênio na produção de curdlana foi feito por Jiang (2013)<sup>98</sup>, utilizando *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749. Nesse estudo, a máxima produção obtida de curdlana foi de 28,16 g/L.

#### 7.8.4 Alginato

O alginato é amplamente utilizado como espessante, estabilizador, gelificante e emulsificante nas indústrias de alimentos, têxteis, farmacêuticas e fabricação de papel. O alginato é um copolímero linear formado por ácidos  $\alpha$ -L-gulurônicos e  $\beta$ -D-manurônicos com ligações 1-4<sup>99,100</sup>.

O alginato comercial atualmente é extraído de algas tais como a *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* e *Macrocystis pyrifera*. Entretanto, micro-organismos como *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas aeruginosa* produzem alginato. A sua produção por micro-organismos pode permitir uma exploração controlada de fontes naturais, e a produção pode ser realizada sob condições controladas, usando substratos de qualidade constante e permitindo assim a obtenção de materiais específicos com características uniformes<sup>99-102</sup>.

### 7.9 REALÇADORES DE SABOR

Há compostos que intensificam o aroma de um gênero alimentício, apesar de não possuírem odor ou gosto (*flavor*) nas concentrações utilizadas. Os efeitos dos realçadores de sabor referem-se às sensações de frescor, volume, consistência, sensibilidade e velocidade de percepção<sup>103</sup>. Os realçadores de sabor são amplamente utilizados em diversos produtos industrializados, como sopas, salgadinhos, batatas fritas, macarrões, temperos e comidas congeladas, além de estarem presentes naturalmente em diversos produtos de origem vegetal e também em produtos de origem animal, como carne, queijo e leite.

Os realçadores de sabor se dividem basicamente em dois grandes grupos: os glutamatos e os diferentes derivados dos 5'-nucleotídeos<sup>104</sup>.

### 7.9.1 Glutamato monossódico

O glutamato monossódico (MSG) é o mais utilizado e conhecido realçador de sabor. Descoberto em 1908 pelo pesquisador japonês Kikunae Ikeda, o MSG, como é conhecido, tem um gosto que não é explicado pela combinação de nenhum dos sabores já existentes, assumindo-se então, já comprovadamente, a existência do quinto sabor, o umami.

O primeiro processo industrial de produção de MSG fundamentava-se em um método de extração no qual as proteínas vegetais eram tratadas com ácido hidrocloreídrico para romper as cadeias peptídicas. O ácido L-glutâmico era então isolado desse material e purificado como MSG. Devido às muitas desvantagens inerentes a esse método, a produção inicial de MSG era limitada. Apenas em 1956 um método fermentativo de produção foi desenvolvido<sup>105</sup>. Como vantagens da produção biotecnológica pode-se citar a redução dos custos de produção e da poluição ambiental.

Segundo a FDA, o glutamato monossódico é reconhecido como seguro (GRAS). Outros comitês internacionais, como o Comitê Científico Europeu para Alimentos, a ANVISA e a Associação Médica Americana, também consideraram o MSG e outros realçadores de sabor seguros.

Atualmente, a maior parte do MSG comercial é produzida por processo fermentativo. De acordo com Sano (2009)<sup>105</sup>, a produção total mundial de MSG por fermentação é estimada em 2 milhões de toneladas/ano.

A maioria das bactérias produtoras de ácido glutâmico são gram-positivas em forma não esporulada, sem motilidade, e requerem biotina para crescer. Essas bactérias podem utilizar diversas fontes de carbono para crescer como glucose, sacarose, maltose, ribose e xilose. Para produção industrial, diversos substratos são utilizados, como amido de tapioca, melão de cana e melão de beterraba.

### 7.9.2 5 Nucleotídeos

Os nucleotídeos utilizados como realçadores de sabor incluem os diferentes sais de inosina monofosfato 5' (IMP), adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato 5'(GMP) e xanilato monofosfato (XMP). O AMP encontrado em vegetais, crustáceos e moluscos, o IMP em carne e peixe, o GMP em cogumelos, especialmente no *shiitake*. A intensidade dos realçadores de sabor e suas concentrações estão diretamente relacionadas. Além de os nucleotídeos terem efeito superior ao MSG nas mesmas concentrações,

eles possuem um forte efeito sinérgico juntos; dessa forma, a mesma concentração de ambos misturados possui um efeito 16 vezes maior que o MSG utilizado isoladamente. Uma vez que baixas concentrações desses realçadores são suficientes para dar sabor, esses produtos são benéficos para pessoas que não podem ingerir grandes quantidades de sal.

A produção industrial de IMP e GMP é alcançada principalmente através da quebra do ácido ribonucleico (RNA) e extração de nucleotídeos ou por fermentação microbiana utilizando diferentes micro-organismos, como *Corynebacterium* e *Escherichia coli*<sup>106</sup>.

### 7.9.3 Maltol

O maltol é um composto que não se enquadra nem nos glutamatos nem nos aminoácidos. De acordo com DeMan (1999)<sup>43</sup>, ele aumenta a percepção da doçura em alimentos ricos em carboidratos como sucos e geleias. Esse composto possui um odor caramelizado e é permitido pela FDA, sendo liberado pela ANVISA como aromatizante (Consulta Pública nº 86, Decreto nº 3.029, 2005)<sup>107</sup>. O maltol pode ser produzido pelo aquecimento da maltose (açúcar do malte) e lactose (açúcar do leite), e também é produzido por processos fermentativos por micro-organismos obtidos a partir da tecnologia do DNA recombinante.

### 7.9.4 Acesulfame de potássio e aspartame

Conhecidos popularmente pela utilização como adoçantes, esses dois edulcorantes também possuem função como realçadores de sabor em gomas de mascar. O adoçante aspartame (éster metílico da L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina) é produzido em escala de quilotoneladas pela Holland Sweetner Company, uma *joint venture* formada pela Tosoh e DSM. O processo de produção do aspartame utiliza uma enzima proteolítica, a termolisina, para catalisar a formação de um dipeptídeo derivado do ácido L-aspártico N-protetido e do éster metílico da DL-fenilalanina<sup>108</sup>. O ácido L-aspártico também é obtido por biocatálise promovida por uma aspartase que catalisa a adição de amônia ao ácido fumárico<sup>108</sup>.

## 7.10 SURFACTANTES

A palavra surfactante vem da expressão “*surface active agent*”, significando “agente de atividade superficial”. Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos, são comercializados na maioria dos países industrializados na forma sintética de derivados do petróleo. Estes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais como petróleo, petroquímico, alimentos, bebidas, cosméticos, farmacêutico, mineração, metalúrgico, agroquímico, fertilizantes, ambiental como biorremediação de solos e indústria de papel e celulose. Devido à sua atividade tensoativa, os surfactantes apresentam importantes propriedades, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases.

Conforme Barros, Quadros e Pastore (2008)<sup>109</sup>, os biossurfactantes são compostos com a mesma atividade tensoativa dos surfactantes, porém são de origem natural, já que são produzidos por várias espécies de micro-organismos. Esses compostos compreendem uma grande diversidade de moléculas quimicamente diferentes como glicolipídios, lipossacarídeos, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, lipopeptídios. Segundo Nitschke e Pastore (2002)<sup>110</sup> os glicolipídios podem ser produzidos por: *Pseudomonas aeruginosa*, *Torulopsis bombicola*, *T. apícola*, *Rhodococcus erythropolis* e *Mycobacterium sp.*; os lipopeptídios e lipoproteínas, por *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis* e *Bacillus polymyxa*; os ácidos graxos, por *Corynebacterium lepus*; os lipídios neutros, por *Nocardia erythropolis*; os fosfolipídios produzidos por *Thiobacillus thiooxidans*; os surfactantes poliméricos por *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida tropicalis* e os biossurfactantes particulados produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus*.

O uso de técnicas como do DNA recombinante também podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos biológicos de baixo custo e elevado rendimento para a indústria, como o processo de produção de surfactantes. Dwyer et al. (2014)<sup>111</sup>, demonstrou que a bactéria *E.coli* geneticamente modificada foi capaz de produzir 4,8 mg de proteína surfactante recombinante com rendimento de 84% após a microfiltração simples. A Tabela 7.10 apresenta alguns estudos de produção de biossurfactantes.

Tabela 7.10 Produção de biossurfactantes utilizando diferentes substratos/suportes

SUBSTRATO/ SUORTE	MICRO-ORGANISMO	ESTUDO BIOPROCESSO	PRODUTO	REFERÊNCIA
Meio basal salina	<i>Oceanobacillus sp.</i> BRI 10	Estudo de biossurfactantes isolados de micro-organismos da água do Oceano Atlântico	Biossurfactante	112
Suco de caju clarificado	<i>Bacillus subtilis</i> LAMI 005	Estudo cinético de biossurfactante produzidos por FSm	Biossurfactante semipurificado	113
Okara (resíduo da produção do leite de soja) Bagaço de cana	<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448	FES	Surfactina	114
Manipueira pré-tratada	<i>Bacillus subtilis</i> LB5a	Estudo das propriedades emulsificantes e estabilidade de biossurfactante produzidos por FSm	Biossurfactante semipurificado	109

Legenda: FES, fermentação no estado sólido; FSm, fermentação submersa.

A grande vantagem dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintetizados quimicamente é que os naturais possuem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além de suportarem extremos de temperatura, pH e salinidade. De maneira geral, há uma tendência ao uso de biossurfactantes em substituição aos surfactantes de origem petroquímica (sintéticos), como alquil benzenos ramificados, que podem ocasionar problemas ambientais.

## 7.11 CONCLUSÕES

Intensa pesquisa vem sendo conduzida nas últimas décadas na busca de soluções biotecnológicas com vistas à produção de bioprodutos de interesse comercial. Os aditivos químicos vêm sendo aos poucos substituídos pelos aditivos biológicos e naturais, que obtêm cada vez mais espaço no mercado mundial. Destacam-se os aminoácidos como o glutâmico, os ácidos orgânicos e as gomas cuja produção por via biotecnológica tem aumentado significativamente nos últimos anos. O desenvolvimento de novas técnicas e a utilização de matérias-primas mais baratas (como os resíduos e subprodutos agrícolas e agroindústrias) têm consolidado as tecnologias de produção desses bioaditivos cuja demanda vem crescendo de forma global.

## **7.12 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Mesmo que os bioaditivos sejam produtos que já atingiram uma ampla escala de aplicação biotecnológica, recentes inovações tecnológicas como recombinação genética, fusão celular, nanotecnologia e desenvolvimento de biorreatores vêm sendo pesquisadas e aplicadas na melhoria de sua produtividade em escala industrial. Em função desse potencial comercial, a indústria brasileira poderá ter grandes benefícios, pois dispõe de grande abundância de matérias-primas de resíduos agroindústrias, fundamentais para a produção de bioaditivos de forma competitiva com demais países produtores.

## REFERÊNCIAS

1. Krzyczkowska J, Bialecka-Florjanczyk E, et al. Biotechnological Methods for Producing Odoriferous Substances. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc.* 2009;16(3):5-18.
2. Anprung P, Charoensiddhi S. Characterization of Bael Fruit (*Aegle Marmelos* [L.] Correa) Hydrolysate as Affected by Enzyme Treatment. *Journal of Food Biochemistry.* 2010;34(6):1249-67.
3. Copikova J, Uher M, et al. Natural colorant. *Chemicke Listy.* 2005;99(11):802-16.
4. Global Information Inc. [Internet]. Premium Market Research Reports. Global Information Inc. [Cited 2013 Nov 18] Available from: <http://www.prnewswire.com/news-releases>. English.
5. ANVISA. Regulamentação de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia no Brasil. Portaria n. 540, 27 oct 1997.
6. Soccol CR, Pandey A, Larroche C. *Fermentation Processes Engineering in the Food Industry.* Boca Raton: CRC Press; 2013. 510 p.
7. ANVISA. Lei do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Lei n. 9782, 26 jan 1999.
8. ANVISA. Registro e Dispensa de Registros em Alimentos. RDC n. 27/2010.
9. Gava AJ. *Princípios de tecnologia de alimentos.* São Paulo: NBL Editora; 1978. 284 p.
10. Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Thorngate J. *Food Additives.* Boca Raton: CRC Press; 2001. 952 p.
11. Lewis RJ. *Food Additives Handbook.* New York: Van Nostrand Reinhold; 1989. 592 p.
12. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. *Tecnologia de alimentos.* São Paulo: NBL Editora; 2009. 511 p.
13. Angumeenal AR, Venkappayya D. An overview of citric acid production. *LWT – Food Science and Technology.* 2013;50:367-70.
14. Rodrigues C, Vandenberghe LPS, Sturm W, Dergint DEA, Spier MR, Carvalho JC, Soccol CR. Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus* sp. mutants in SSF. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(12):2317-24.
15. Ramachandra YL, Narayanamurthy G, Jois S, Chavan A, Satwadi PR. Production of Citric Acid in Basal Coffee Husk Medium by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation. *Advances in Biological Research.* 2013;7(6):234-40.
16. Bari MD, Alam, MZ, Muyibi SA, Jamal P, Al-Mamun A. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresource Technology.* 2009;100:3113-20.
17. Barrington S, Kim JW. Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. *Bioresource Technology.* 2008;99:368-77.

18. Haq IU, Ali S, Iqbal J. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 2003;38:921-4.
19. Awad HM, Diaz R, Malek RA, Othman NZ, Aziz RA, El Enshasy HA. Efficient Production Process for Food Grade Acetic Acid by *Acetobacter aceti* in Shake Flask and in Bioreactor Cultures. *E-Journal of Chemistry*. 2012;9(4):2275-86.
20. Adams MR. Vinegar. In: Wood JB, editor. *Microbiology of fermented foods*. Vol 1. London: Blackie Academic & Professional; 1998. p. 1-44.
21. Gullo M, Caggia C, De Vero L, Giudici P: Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106:209-12.
22. Kondo T, Kondo M. Efficient production of acetic acid from glucose in a mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Acetobacter* sp. *J Ferm Bioeng*. 1996;81:42-6.
23. Wang Z, Yan M, Chen X, Li D, Qin L, Li Z, Yao J, Liang X. Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production. *Biochemical Engineering Journal*. 2013;79:41-5.
24. Ito T, Sota H, Honda H, Shimizu K, Kobayashi T. Efficient Acetic Acid Production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1991;36:295-9.
25. Gao C, Ma C, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*. 2011;29:930-9.
26. Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *J Chem Technol Biotechnol*. 2006;81:1119-29.
27. Abdel-Rahmana MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2011;156:286-301.
28. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013;31(6):877-902.
29. Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004;7(2):167-79.
30. Moon SK, Wee YJ, Choi GW. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *J Biosci Bioeng*. 2012;114:155-9.
31. Karp SG, Igashiyama AH, Siqueira PF, Carvalho JC, Vandenberghe LPS, Thomaz-Soccol V, Coral J, Tholozan J-L, Pandey A, Soccol CR. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soy bean vinasse at laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*. 2011;102:1765-72.
32. Wang L, Zhao B, Liu B, Yang C, Yu B, Li Q, et al. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresour Technol*. 2010;101:7895-901.

33. Budhavaram NK, Fan Z. Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulan* strains. *Bioresour Technol.* 2009;100:5966-72.
34. Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:333-5.
35. Li A, Punt P. Industrial production of organic acids by fungi. In: Gupta VK, Schmoll M, Maki M, Tuohy M, Mazutti MA. *Applications of Microbial Engineering.* Boca Raton: CRC Press; 2013. 504 p.
36. Engel CA, Straathof AJJ, Zijlmans TW, Van Gulik WM, Van der Wielen LAM. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;78:379-89.
37. Gu C, Zhou Y, Liu L, Tan T, Deng L. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net. *Bioresource Technology.* 2013;131:303-7.
38. Wang G, Huang D, Qi H, Wen J, Jia X, Chen Y. Rational medium optimization based on comparative metabolic profiling analysis to improve fumaric acid production. *Bioresource Technology.* 2013;137:1-8.
39. Yu S, Huang D, Wen J, Li S, Chen Y, Jia X. Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by fem to second laser irradiation. *Bioresource Technology.* 2012;114:610-5.
40. Zhou Z, Du G, Hua Z, Zhou J, Chen J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. *Bioresource Technology.* 2011;102(20):9345-9.
41. Fu Y, Xu Q, Li S, Huang H, Chen Y. A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* Short Communication. 2009.
42. Samaranyaka AGP, Li-chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods.* 2011;3(4):229-54.
43. DeMan JM. *Principles of Food Chemistry.* 3 ed. Nova York: Springer; 1999.
44. Bremus C, Herrmann U, Bringer-Meyer S, Sahm H. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of Biotechnology.* 2006;124(1):196-205.
45. Sauer M, Branduardi P, Valloi M, Porro D. Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Applied Environmental Microbiology.* 2004;70(10):6086-91.
46. Belitz H-D, Grosch W, Schierbele P. *Food Chemistry.* 3 ed. New York: Springer; 2004.
47. Branen AL, Davdson PM, Salminen S, Thorngate III JH. *Food Additives.* 2 ed. New York: Marcel Dekker; 2002.
48. Institute of Medicine. *Dietary Reference Indicators for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.* Washington: NAP; 2000. Chapter 6.

49. Ogbonna JC, Tomiyama S, Tanaka H. Production of  $\alpha$ -tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic *Euglena gracilis*. *Journal of Biotechnology*. 1999;6(1-3):213-21.
50. Durmaz Y. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*. 2007; 272(1-4):717-22.
51. Campanella L, Pacifici F, Sammartino MP, Tomassetti M. A new organic phase bioenzymatic electrode for lecithin analysis in food products. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1998;47(1):25-38.
52. Penci MC, Constenla DT, Carelli AA. Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. *Food Chemistry*. 2010;120(1):332-8.
53. Yamazaki K, Imai M, Suzuku I. Soybean lecithin hydrolysis using hog pancreas phospholipase A2 influenced by the hydrophobic character of W/O microemulsion systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2004;19(2)171-9.
54. King EJ. The enzymatic hydrolysis of lechitin. *Biochemistry Journal*. 1931;25(3)799-811.
55. Lin Y, Yan T. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microbial Cell Factories*. 2012;11(42)1-9.
56. Lokeswari N, Reddy SR. Microbiological Production of Gallic Acid By a Mutant Strain of *Aspergillus Oryzae* Using Cashew Husk. *Pharmacophore*. 2010;1(2)112-22.
57. Vattem DA, Shetty K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*. 2003;39:367-79.
58. Noshly [Internet]. Food additives & Ingredients Reference [Cited 2013 Nov 5]. Available from: <http://noshly.com/>.
59. Internacional Organization of Flavor Industry (IOFI) [Internet] [Cited 2013 Dec 4]. Available from: [http://www.abifra.org.br/base\\_iofi.pdf](http://www.abifra.org.br/base_iofi.pdf).
60. ANVISA [Internet]. Resolução n. 104, 1999 May 14. Consulta Pública n. 55, 2005 Jul 28 [Cited 2013 Dec 4]. Available from: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B11218-1-0%5D.PDF>.
61. Edris AE, Malone CR. Formulation of banana aroma impact ester in water-based microemulsion nano-delivery system for flavoring applications using sucrose laurate surfactant. *Procedia Food Science*. 2011;1:1821-7.
62. Kim Y, Kim YS, Yoo SH, Kim KO. Molecular structural differences between low methoxy pectins induced by pectin methyl esterase II: Effects on texture, release and perception of aroma in gels of similar modulus of elasticity. *Food Chemistry*. 2014;145: 950-5.

63. Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) [Internet]. Compêndio da Legislação de Alimentos. Revisão n. 8. 2001. Available from: <http://abia.org.br/anexos2012/livro50anosABIA.pdf>.
64. Rossi SC, Vandenberghe LPS, Pereira BMP, Gago FD, Rizzolo JA, Pandey A, Soccol CR, Medeiros ABP. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Research International*. 2009;42:484-6.
65. Mantzouridou F, Paraskevopoulou A. Volatile Bio-ester Production from Orange Pulp-Containing Medium Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Bioprocess Technology*. 2012.
66. Nogueiro-Pato R, Torrado-Agrasar A, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. Influence of new generation fungicides on *Saccharomyces cerevisiae* growth, grape must fermentation and aroma biosynthesis. *Food Chemistry*. 2014;146:234-41.
67. Sieiro C, Villa TG, Silva AF, García-Fraga B, Vilanova M. Albariño wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Chemistry*. 2014;145:179-85.
68. Jelen H, Majcher M, Ginja A, Kuligowski M. Determination of compounds responsible for tempeh aroma. *Food Chemistry*. 2013;141:459-65.
69. Sampaio A, Dragone G, Vilanova M, Oliveira JM, Teixeira JA, Mussatto SI. Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground. *Food Science and Technology*. 2013;54:557-63.
70. Cvjetko M, Vorkapic-Furac J, Znidarsic-Plazl P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. *Process Biochemistry*. 2012;47:1344-50.
71. Insumos [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. 2013. Conservação de alimentos por aditivos químicos. Available from: [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/125.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/125.pdf).
72. Dishisha T, Ståhl A, Lundmark S, Hatti-Kaul R. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. *Bioresource Technology*. 2013;135:504-12.
73. Guan N, Liua L, Shin H-dong, Chen RR, Zhang J, Li J, Du G, Shi Z, Chen J. Systems-level understanding of how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: Mechanism and application. *Journal of Biotechnology*. 2013;167:56-63.
74. Wang P, Wang Y, Liu Y, Shi H, Su Z. Novel in situ product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 by expanded bed adsorption bioreactor. *Bioresource Technology*. 2012;104:652-9.
75. U.S. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. c. 1993 [Cited 2013 Nov 1]. Food Color Facts. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/colorfac.html>.

76. ANVISA. Resolução n. 4, 1988 Sep 24 [Cited 2013 Nov 1]. Available from: [www.anvisa.gov](http://www.anvisa.gov).
77. Carvalho JC, Cardoso LC, Ghiggi V, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPS, Soccol CR. Microbial Pigments. In: Brar SK, Dhillon GS, Soccol CR, editors. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. 1st ed. New York: Springer; 2014. p. 73-97.
78. Yarnell A. Bringing blue to a plate near you. *Chemical and Engineering News*. 2012;37:30-31.
79. Kleinegriss DMM, Janssen M, Brandenburg WA, Wijffels RH. Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011;48:253-9.
80. Yang J, Tan H, Yang R, Sun X, Zhai H, Li K. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* fermentation of cassava residues substrate. *Agricultural Engineering International*. 2011;13:1-6.
81. Papaioannou EH, Liakopoulou-Kyriakides M. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. *Food and Bioproducts Processing*. 2010;8:305-11.
82. Varzakakou M, Roukas T, Kotzekidou P. Effect of the ratio of (+) and (-) mating type of *Blakeslea trispora* on carotene production from cheese whey in submerged fermentation. *World J Microbiology Biotechnology*. 2010;26:2151-6.
83. Domínguez-Espinosa RM, Webb C. Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003;19(3):329-36.
84. Carvalho JC, Oishi BO, Woiciechowski AL, Pandey A, Soccol CR. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-substrate fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian J of Biotechnology*. 2007;6:194-9.
85. Rangel-Yagui CO, Danesi EDG, Carvalho JCM, Sato S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*. 2004;92:133-41.
86. Mapari S, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorant. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005;16(2):231-8
87. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. *Tecnologia de alimentos*. São Paulo: NBL Editora; 2009. 511 p.
88. Kiosseoglou A, Papalamprou E, Makri E, Doxastakis G, Kiosseoglou V. Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *Xanthomonas Campestris* ATCC 1395 in batch culture. *Food Research International*. 2003;36:425-30.
89. Freitas F, Alves VD, Reis MAM. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*. 2011;29(8):388-98.

90. Mabrouk MEM, ElAhwany AMD, Beliah MMB, Sabry SA. Xanthan production by a novel mutant strain of *Xanthomonas campestris*: Application of statistical design for optimization of process parameters. *Life Sci J.* 2013;10(1):1660-7.
91. Ben Salah R, Chaari K, Besbes S, Ktari N, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Optimization of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chemistry.* 2010;121(2):627-33.
92. Silva MF, Fornari RCG, Mazutti MA, de Oliveira D, Padilha FF, Cichoski AJ, Cansian RL, Di Luccio M, Treichel H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering.* 2009;90(1):119-23.
93. Menezes JDS, Druzian JI, Padilha FF, de Souza RR. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.* 2012;8(8):1761-76.
94. Jin H, Lee NK, Shin MK, Kimc SK, Kaplan DL, Lee JW. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. *Biochemical Engineering Journal.* 2003;16:357-60.
95. Bajaj IB, Saudagar PS, Singhal RS, Pandey A. Statistical Approach to Optimization of Fermentative Production of Gellan Gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2006;102(3):150-6.
96. Nampoothiri KM, Singhanian RR, Sabarinath C, Pandey A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry.* 2003;38:1513-9.
97. Salah RB, Jaouadi B, Bouaziz A, Chaari K, Blecker C, Derrouane C, Attia H, Besbes S. Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466: Purification, rheological and physico-chemical characterization. *LWT – Food Science and Technology.* 2011;44:1026-34.
98. Jiang L. Effect of nitrogen source on curdlan production by *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2013;52:218-20.
99. Chèze-Lange H, et al. Production of microbial alginate in a membrane bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology.* 2002;30:656-61.
100. Moresi M, Bruno M, Parente E. Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests. *Journal of Food Engineering.* 2004;64:179-86.
101. Saude N, et al. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor. *Process Biochemistry.* 2002;38:273-8.
102. Müller JM, dos Santos RL, Brigido RV. Produção de alginato por micro-organismos. *Polímeros.* 2011;21(4):305-10.
103. Belitz H-D, Grosch W, Schierbele P. *Food Chemistry.* 3 ed. New York: Springer; 2004.
104. Goldberg I, Villiams R. *Biotechnology and food ingredients.* New York: Springer; 1991.

105. Sano C. History of glutamate production. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;90(3):728-32.
106. Ledesma-Amaro R, Jiménez A, Santos M, Revuelta JL. Biotechnological production of feed nucleotides by microbial strain improvement. *Process Biochemistry*. 2013;48(9):1263-70.
107. ANVISA. Regulamento técnico sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as boas práticas de fabricação (BPF). Resolução RDC n. 45, 3 nov. 2010.
108. Oliveira LG, Mantovani SM. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Química Nova*. 2009;32(3):742-56.
109. Barros FFC, Quadros CP, Pastore GM. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008;28(4):979-85.
110. Nitschke M, Pastore GM. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*. 2002;25(5):772-6.
111. Dwyer MD, Brech M, Yu L, Middelberg APJ. Intensified expression and purification of a recombinant biosurfactant protein. *Chemical Engineering Science*. 2014;105:12-21.
112. Jadhav VV, Yadav A, Shouche YS, Aphale S, Moghe A, Pillai S, Arora A, Bhadekar RK. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. *Desalination*. 2013;318:64-71.
113. Oliveira DWF, França IWL, Félix AKN, Martins JJJ, Giro MEA, Melo VMM, LRB Gonçalves. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;101:34-43.
114. Slivinski CT, Mallmann E, Araújo JM, Mitchell DA, Krieger N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*. 2012;47:1848-55.

