

AValiação DO EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HEXOSES E PENTOSAS NA PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS POR *Monascus ruber*Maria Teresa F. R. Raymundo^{1*}, Gabriel L. de Arruda², Sílvio S. da Silva³, Júlio C. dos Santos⁴

1. Estudante de Engenharia Bioquímica da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP)
2. Doutorando em Biotecnologia Industrial na EEL-USP
3. Professor titular na EEL -USP
4. Professor associado na EEL -USP /Orientador

Resumo

O mercado consumidor tem se tornado mais exigente na busca e no consumo de produtos de origem natural e que promovam benefícios à saúde. Desta forma, o uso e aplicação de biopigmentos microbianos torna-se uma alternativa interessante para a substituição de pigmentos de origem sintética, visto que, além de promover a cor, os biopigmentos apresentam características adicionais, como propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Entretanto, os custos do processo de produção de biopigmentos ainda são maiores em relação aos pigmentos sintéticos, podendo limitar sua maior aplicação industrial. Neste contexto, o uso de resíduos ou subprodutos agroindustriais na composição do meio de cultivo para a produção de biopigmentos de *Monascus* pode resultar em redução de custos relacionados à produção. Considerando que estes materiais apresentam hexoses e pentoses em sua composição, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do uso de glicose e xilose como fonte de carbono para a produção de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho pelo fungo *Monascus ruber*. Para isso, foram realizados experimentos empregando glicose e xilose como fonte de carbono, avaliando-se também o uso de diferentes fontes de nitrogênio: extrato de levedura, glutamato monossódico, nitrato de sódio, peptona bacteriológica e extrato de farelo de arroz (EFA). A fonte de nitrogênio que promoveu a melhor resposta de produção de biopigmentos foi o EFA, sendo selecionada para os experimentos com diferentes fontes de carbono, os quais foram conduzidos conforme planejamento estatístico para avaliar a influência das variáveis concentração de glicose, de xilose e de EFA. Observou-se que a variável mais influente na produção de biopigmentos foi a concentração de EFA. Uma produção máxima de 41,03 UA, 34,94 UA e 44,13 UA de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente, foi observada empregando-se 30 g.L⁻¹ de glicose e 100% v/v de EFA na formulação do meio. Os resultados mostraram o potencial de uso do farelo de arroz como fonte alternativa na produção de biopigmentos, representando fonte renovável, sustentável e abundante no país, tendo sido gerado conhecimento que servirá de base a estudos futuros para utilização de materiais lignocelulósicos como fonte alternativa e renovável de carbono.

Palavras-chave: Biopigmentos; *Monascus ruber*; farelo de arroz

Apoio financeiro: Programa Unificado de Bolsas da Universidade de São Paulo (PUB-USP)

Trabalho selecionado para a JNIC: EEL/USP

Introdução

Os pigmentos são componentes importantes em produtos de diferentes setores industriais, como o alimentício, sendo capazes de torná-los mais atrativos ao consumidor. Em grande maioria, os pigmentos utilizados na indústria de alimentos são de origem sintética, principalmente devido ao seu baixo custo. Entretanto, o mercado consumidor tem se tornado mais criterioso em relação aos aditivos sintéticos potencialmente prejudiciais à saúde e que entram na composição dos alimentos. Desta forma, a substituição dos pigmentos sintéticos por alternativas de origem natural é interessante, podendo também agregar propriedades benéficas aos alimentos industrializados (ARULDASS; DUFOSSÉ; AHMAD, 2018).

Os pigmentos naturais podem ser de origem animal, vegetal ou produzidos por microorganismos. Os biopigmentos microbianos podem ser produzidos por diferentes grupos de microorganismos como bactérias, leveduras ou fungos filamentosos, apresentando vantagens em relação aos pigmentos vegetais, como a não dependência de condições climáticas e ambientais para sua obtenção, além da não competição com terras agricultáveis e a possibilidade de uso de fontes alternativas (resíduos e subprodutos agroindustriais) na formulação de meios de cultivo (PANESAR, R.; KAUR; PANESAR, P. S., 2015).

A principal limitação na produção industrial de biopigmentos microbianos é relacionada aos elevados

custos da matéria prima, tornando-os ainda pouco competitivos com os pigmentos sintéticos. Desta forma, uma alternativa interessante seria utilizar resíduos e subprodutos agroindustriais como nutrientes para compor o meio de cultivo, reduzindo os custos do processo (PANESAR, R.; KAUR; PANESAR, P. S., 2015). No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar corresponde a um subproduto abundante do setor sucro-alcooleiro, sendo que suas frações celulose e hemicelulose podem ser utilizadas como fonte de carbono em bioprocessos (TERÁN HILARES et al., 2018). Outro importante subproduto agrícola, o farelo de arroz, contém nutrientes que podem ser utilizados, por exemplo, como fonte de nitrogênio e micronutrientes no crescimento de microrganismos, sendo uma alternativa potencial para substituir outras fontes de alto custo (MILESSI et al., 2013).

Outro fator fundamental na produção industrial de biopigmentos é a escolha da cepa microbiana, sendo que alguns requisitos são essenciais como a não patogenicidade, capacidade de metabolizar diversas fontes de carbono, adaptação a meios fermentativos derivados de resíduos agroindustriais e tolerância a uma ampla faixa de pH e temperatura. Dentre os microrganismos utilizados para produção de biopigmentos, destacam-se os fungos do gênero *Monascus*, os quais apresentam alta estabilidade e elevada produtividade em biopigmentos amarelo, laranja e vermelho, bem como produção conjunta de metabólitos secundários de interesse (AGBOYIBOR et al., 2018; PATAKOVA, 2013).

Os pigmentos produzidos por fungos do gênero *Monascus* possuem diversas características que os tornam atrativos comercialmente, como seu potencial antioxidante, antimicrobiano e cicatrizante (VENDRUSCOLO et al., 2016). Além disso, os biopigmentos de *Monascus* possuem alta estabilidade à luz, pH e temperatura, solubilidade em solventes polares como água e álcool e biodegradabilidade, características pelas quais são bastante estudados (AGBOYIBOR et al., 2018).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho pelo fungo *Monascus ruber* em meios baseados em glicose e xilose, avaliando-se também o emprego de diferentes fontes de nitrogênio. Planejamento estatístico foi empregado como ferramenta de estudo do efeito, na produção de biopigmentos, das concentrações de glicose ou xilose (em planejamentos conduzidos em separado) e da concentração da fonte de nitrogênio selecionada. Tem-se também como um dos objetivos contribuir para futuros estudos do uso de materiais lignocelulósicos como fonte de carbono no processo, considerando que estes possuem hexoses e pentoses em sua composição.

Metodologia

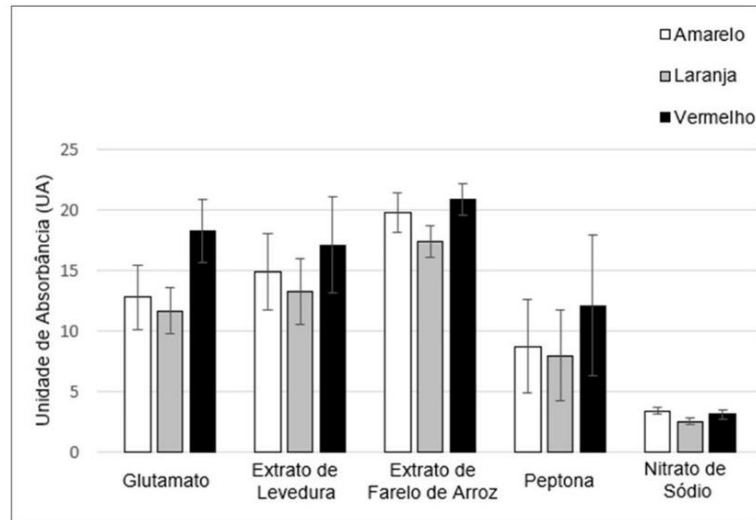
Os ensaios de fermentação para avaliação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biopigmentos de *Monascus ruber* foram realizados em frascos de 50 mL com volume de fermentação de 20 mL, empregando discos de micélio-ágar (8 mm de diâmetro) como inóculo, em meio líquido composto de glicose (40 g·L⁻¹) e suplementação mineral, conforme Terán Hilares et al. (2018). Foram formulados meios empregando cinco diferentes fontes de nitrogênio: glutamato monossódico, extrato de levedura, extrato de farelo de arroz (EFA), peptona bacteriológica e nitrato de sódio (todos com uma quantidade de nitrogênio total de 4 g·L⁻¹). O EFA foi obtido conforme Milessi et al. (2013). Os cultivos foram conduzidos em triplicata a 30 °C, pH inicial 6,0 e agitação de 150 rpm, durante 15 dias.

Os ensaios para avaliação da influência das concentrações de fonte de carbono e nitrogênio na produção dos biopigmentos amarelo, laranja e vermelho, por sua vez, foram realizados conforme planejamento estatístico 2² composto central face centrada, com triplicata no ponto central. Foram avaliados intervalos de concentração das fontes de carbono de 20 a 40 g·L⁻¹ para glicose ou xilose (cada fonte avaliada em planejamentos conduzidos em separado), sendo que, para a fonte de nitrogênio, a variação foi de 20 a 100% v/v de EFA no meio. Nestes experimentos, os cultivos foram conduzidos durante 16 dias, em frascos de 125 mL e volume de fermentação de 50 mL, com a mesma suplementação mineral, agitação e temperatura usadas na avaliação das fontes de nitrogênio. Os resultados foram analisados com auxílio do programa STATISTICA v. 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Resultados e Discussão

Nos experimentos de avaliação de diferentes fontes de nitrogênio, a maior produção dos biopigmentos foi observada no cultivo empregando EFA, com obtenção de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho de 19,78 UA, 17,44 UA e 20,84 UA, respectivamente (Figura 1). Conforme se pode observar na Figura 1, a produção empregando o EFA resultou em produção de biopigmentos similar ou superior à obtida empregando fontes usuais e mais caras, como extrato de levedura e glutamato.

Figura 1. Produção de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho pelo fungo *Monascus ruber*, empregando glicose como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio (resultados apresentados como média de triplicatas ± desvio padrão)



Fonte: Autor

Os resultados do planejamento experimental utilizando glicose como fonte de carbono demonstraram produção máxima de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente, de 41,03 UA, 34,94 UA e 44,13 UA, observada empregando-se 30 g.L⁻¹ de glicose e 100% v/v de EFA. Os cultivos com menores quantidades da fonte de nitrogênio, por sua vez, corresponderam aos ensaios que apresentaram as menores produções de biopigmentos. A análise estatística dos efeitos (Tabela 1) confirmou que a variável a qual exerceu maior influência na produção de biopigmentos em meio baseado em glicose foi a concentração da fonte de nitrogênio (extrato de farelo de arroz), com um efeito linear significativo e positivo ($p < 0,05$).

No planejamento experimental conduzido utilizando xilose como fonte de carbono, foi observado que os valores máximos de produção de biopigmentos foram os obtidos no ensaio no qual foram utilizadas as máximas concentrações de fontes carbono e nitrogênio, com uma produção de 40,32 UA, 39,15 UA e 51,09 UA de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. A Tabela 1 apresenta a análise estatística dos efeitos, sendo que, também para a xilose, a concentração de extrato de farelo de arroz foi a variável que exerceu maior influência na produção dos biopigmentos, com um efeito linear positivo e quadrático negativo significativos ($p < 0,1$) na produção de biopigmentos amarelos, e efeitos quadráticos negativos significativos para os biopigmentos laranja e vermelho.

Tabela 1: Efeito estimado, erro padrão (EP) e p -valor para as respostas produção de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho, correspondentes à análise estatística do planejamento experimental realizado com glicose e xilose como fontes de carbono

Variável	Produção de biopigmentos amarelos (UA)			Produção de biopigmentos laranjas (UA)			Produção de biopigmentos vermelhos (UA)		
	Efeito	EP	p	Efeito	EP	p	Efeito	EP	p
Média	24,25	3,51	0,001 ^a	21,66	2,67	0,0004 ^a	27,8	3,17	0,0003 ^a
Glicose									
(X ₁) Glicose (g/L)	3,71	5,59	0,54	3,16	4,25	0,49	2,18	5,05	0,43
(X ₂) Extrato de farelo de arroz (%v/v)	23,47	5,58	0,008 ^a	20,57	4,25	0,005 ^a	26	5,05	0,004 ^a
X ₁ ²	-6,93	8,6	0,46	-3,48	6,55	0,62	-5,82	7,77	0,49
X ₂ ²	-9,16	8,6	0,34	-9,85	6,55	0,19	-12,07	7,77	0,18
X ₁ X ₂	-0,12	6,84	0,99	-0,16	5,21	0,97	-1,04	6,18	0,87
Média	23,09	4,19	0,003 ^a	22,84	4,12	0,003 ^a	48,71	60,16	0,45
Xilose									
(X ₁) Xilose (g/L)	11,22	6,67	0,15	12,02	6,56	0,13	-4,49	4,02	0,31
(X ₂) Extrato de farelo de arroz (% v/v)	14,56	6,67	0,08 ^b	12,5	6,56	0,11	1,03	0,64	0,17
X ₁ ²	11,99	10,27	0,29	11,49	10,09	0,31	0,07	0,06	0,35
X ₂ ²	-29,97	-10,27	0,033 ^a	-30,99	10,09	0,03 ^a	-0,01	0,004	0,02 ^a
X ₁ X ₂	11,09	8,17	0,23	12,06	8,03	0,19	0,023	0,013	0,14

^asignificativo ao nível de confiança de 95% e ^bsignificativo ao nível de confiança de 90%

Fonte: Autor

Conclusões

Assim como a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio revelou ser uma importante variável na produção dos biopigmentos de *M. ruber*. Das cinco diferentes fontes de nitrogênio avaliadas em meio baseado em glicose, a que mais favoreceu a produção dos biopigmentos de *M. ruber* foi o extrato de farelo de arroz, resultando em

uma produção de 19,7 UA, 17,4 UA e 20,8 UA de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. O farelo de arroz é uma fonte de nitrogênio renovável, sustentável e abundante no Brasil, sendo que os resultados obtidos indicam uma alternativa interessante para aplicação deste subproduto agrícola na produção de bioprodutos de valor agregado.

A realização dos planejamentos estatísticos empregando glicose e xilose como fontes de carbono e extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio, possibilitou a análise da influência de variáveis importantes na produção de biopigmentos amarelo, laranja e vermelho pelo fungo *Monascus ruber*. Foi possível observar que, tanto no meio de cultivo baseado em glicose quanto em xilose, a concentração da fonte de nitrogênio foi a variável que exerceu maior influência na produção de biopigmentos.

Este trabalho demonstra o potencial de produção de biopigmentos em meios contendo diferentes fontes de carbono (glicose e xilose) pelo fungo *M. ruber*, assim como mostra a influência de diferentes fontes de nitrogênio no processo. Os resultados obtidos servirão de base a estudos futuros visando ao emprego de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, como fonte de carbono para o processo, juntamente com o farelo de arroz como fonte de nitrogênio e nutrientes.

Referências bibliográficas

AGBOYIBOR, C. et al. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 433–447, 2018.

ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; AHMAD, W. A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 168–182, 2018.

MILESSI, T. S. S. et al. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 373–379, 2013.

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

PATAKOVA, P. *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 169–181, 2013.

TERÁN HILARES, R. et al. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, v. 245, n. December 2018, p. 786–791, 2018.

VENDRUSCOLO, F. et al. *Monascus*: a Reality on the Production and Application of Microbial Pigments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 211–223, 2016.