

Influência da velocidade específica de crescimento de *Monascus purpureus* ATCC36928 na produção de pigmentos vermelhos

Daniela Gerevini Pereira Pacifico¹, Eugênio Ferreira², Beatriz Vahan Kilikian¹

¹Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da USP
CP 61548 CEP 05424-970, São Paulo, SP, BRASIL

²Departamento de Engenharia Biológica Universidade do Minho
Braga, PORTUGAL

RESUMO

Os pigmentos vermelhos produzidos por *Monascus* sp são substitutos de sais de nitrito (conservantes), os quais são precursores de nitrosamina (cancerígeno). O objetivo deste trabalho foi desenvolver o processo de cultivo contínuo para averbar a produção de pigmentos vermelhos estabelecendo valor adequado da velocidade específica de crescimento (μ), apresentado dados de viabilidade celular e morfologia microbiana. Não há na literatura relatos da aplicação de tal processo para *Monascus purpureus* ATCC36928.

Os valores de D aplicados foram de $0,05 \text{ h}^{-1}$, $0,025 \text{ h}^{-1}$ e $0,1 \text{ h}^{-1}$ ($\mu_{\text{máx}}$ é de $0,15 \text{ h}^{-1}$). O maior valor da produção específica de pigmentos vermelhos ($0,51 \text{ UL.g}$) deu-se sob o menor valor de μ aplicado ($0,025 \text{ h}^{-1}$) comparando-se à situação, de $\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$, para a qual obteve-se $0,22 \text{ UL.g}^{-1}$.

Menor viabilidade na condição de menor μ aplicado ($0,025 \text{ h}^{-1}$), com perdas de 32%. A redução do valor de μ resultou no aumento do comprimento das hifas (20%) e do grau de ramificação (240%).

Palavras Chaves: *Monascus*, velocidade específica de crescimento, pigmento, viabilidade e morfologia.

INTRODUÇÃO

A possibilidade de controle da oferta de substrato no processo contínuo permite o estudo do efeito da velocidade específica de crescimento - μ - na produção de metabólitos, uma vez que há manutenção do estado fisiológico das células. Efeitos da limitação por substrato são observados também na morfologia, por exemplo, na intensificação da aglomeração do micélio e no aumento do grau de ramificação, em função da redução do valor de μ (Nielsen, 1992; McIntire et al., 2001; Muller et al., 2002).

Diversas publicações sobre o tema morfologia apontam a existência de relação entre a produção de um determinado metabólito e a forma da célula (McIntyre et al., 2001; Bocking et al., 1999; Patnaik, 2000; Znidarsic; Pavko, 2001; Kim et al. 2002). No caso da lovastatina (um metabólito secundário produzido por espécies de *Monascus*) de *Aspergillus*

terreus, a produção é favorecida quando as células agrupam-se predominantemente na forma de *pellets* (Moroviján *et al.*, 1997).

Alterações morfológicas específicas podem ser induzidas com base nas condições do processo. Por exemplo, sob carência nutricional pode ocorrer o aumento do número de pontas e alongamento das hifas, o que leva à aglomeração. Corona *et al.* (1997) relata a variação do comprimento e diâmetro de tubos germinativos de *Aspergillus niger* sob diferentes concentrações de glicose. No caso da produção de metabólitos secundários todavia, uma associação direta entre morfologia e produção pode ser equivocada pois, sob condição de limitação nutricional, ocorre redução do valor de μ a qual, não raro, promove aumento da velocidade específica de produção.

Segundo Olsvik; Kristiansen (1994), a velocidade específica de crescimento, μ , pode influenciar indiretamente a reologia do meio em função de alterações morfológicas, como comprimento da hifa e circularidade de *clumps*. Por conseguinte, altera-se o coeficiente de transporte de oxigênio, a concentração de oxigênio dissolvido e a velocidade específica de respiração, q_{O_2} , a qual, finalmente, tem papel decisivo na regulação do metabolismo. Em suma, pode ocorrer simultaneamente ou não, influência do valor de μ , de q_{O_2} e da morfologia, sobre o valor da velocidade específica de produção, μ_P .

No presente trabalho apresentam-se resultados do cultivo de *Monascus purpureus* ATCC 36928 em processo contínuo, sob diferentes valores de μ , obtidos mediante controle da concentração de glicose. O objetivo foi determinar os correspondentes valores de μ_P e a morfologia do bolor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e conservação: *Monascus purpureus* ATCC 36928, adquirido do Centro de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello” (Campinas – SP – Brasil). A suspensão de células utilizada para o armazenamento foi previamente cultivada em 100mL de meio glicosado (g/L: glicose 10.,0; extrato de carne 3.0 e peptona 5.0) por 38 horas, a pH inicial 5,5, erlenmeyer de 500 mL, em incubador rotativo a 30° C, 300 rpm. Promoveu-se o congelamento em ultrafreezer (-80°C), de uma suspensão de células em uma solução de glicerol 20% v/v.

Preparo do inóculo: O inóculo para os ensaios em biorreator foi obtido a partir da ativação da suspensão de células congeladas (-80°C), usando banho a 37°C por 10min. Em seguida, 24ml desta suspensão foram inoculadas em 80ml de meio semi-sintético (PEREIRA e KILIKIAN, 2001), em g/L: glicose 20, MgSO₄.7H₂O 4.8, KH₂PO₄ 1.5, K₂HPO₄ 1.5, ZnSO₄.7H₂O 0.01, glutamato monossódico 7.6, NaCl 0.4, FeSO₄ 0.1 e extrato de levedura 1.0. A suspensão assim obtida foi cultivada por 35h a pH inicial 5.5, erlenmeyer de 500 mL, em incubador rotativo a 30° C e 300 rpm.

Cultivos em biorreator: Os ensaios foram realizados em biorreator *Biostat B* (Braun - Biotech, Melsungen AG, Germany) com 4L de volume útil. O volume foi controlado com base na massa do sistema de cultivo (biorreator e meio).

A Tabela 1 identifica as condições de cultivo impostas ou assumidas, para o estabelecimento de quatro valores de D. As três primeiras condições possuem valores de D inferiores à velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) do fungo e a quarta condição com D acima de μ_{max} .

Tabela 1: Identificação das condições de cultivo.

Condição	Descrição			
Condições de cultivo				
pH	5,5			
Temperatura (°C)	30			
Y _{X/S}	0,5			
C (%)	70<C<100			
N (rpm)	700			
S** (g.L ⁻¹)	5,0			
	1°cond	2°cond	3°cond	4°cond
D (h ⁻¹)	0,05	0,025	0,1	0,25
F (mL.h ⁻¹)	200	100	400	1000
Δt _{previsto} * (h)	60	120	30	12

** : concentração inicial de glicose do cultivo contínuo

* : corresponde a três tempos de residência

Os valores de vazão específica (D) adotados representam 33 %, 16,7%, 66,7% e 167% (situação de varredura), do valor da velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{m\acute{a}x}$, obtido para esse microrganismo, o qual é de 0,15h⁻¹. Para o estabelecimento do estado estacionário, a cada valor de F aplicado, o cultivo era conduzido por tempo equivalente a três tempos de residência ($\Delta t_{previsto}$) – tempo necessário para que o meio fornecido pela vazão de alimentação preencha o volume útil do biorreator.

Métodos analíticos

Concentração celular (X): determinada a partir da pesagem e filtração de um volume conhecido de amostra através de uma membrana 1,20 μm , submetida à secagem por 15 min à potência de 180W em forno microondas.

Medições e classificações morfológicas: foram executadas com equipamento composto por microscópio óptico DM/LS (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera de vídeo DXC-950P (Sony, Tokio, Japão) e um analisador de imagens Q550IW (Leica, Londres, Grã-Bretanha), composto por um computador e o software QWin500. Cada amostra foi representada por 3 lâminas, das quais adquiriram-se cerca de 20 campos de imagem, totalizando aproximadamente 100 elementos mensuráveis de cada lâmina. Previamente à aquisição das imagens, as amostras foram secas, fixadas e coradas com azul de metileno.

Viabilidade celular: foi executada com equipamento composto por um microscópio de epifluorescência (ZEISS, Axioscop, Deutschland) com lâmpada de halogênio e equipamento para fotografia acoplado através de uma Câmara Digital (ZEISS, AxioCam HRc, Deutschland) a um analisador de imagens (ZEISS, AxioVision, Deutschland). Um volume de 2mL da amostra diluída (até 0,1 g/L de células) era corado com 5ml de alaranjado de acridina (1g/L) - ou 2mL de Calceína AM (10mM) e 2mL de Brometo de etídio (2,5mM). Mantinha-se repouso por 5min na ausência de luz. Adquiriram-se cerca de 10 a 20 imagens de cada amostra, em intervalo de no máximo 30min após retirada da amostra.

Pigmentos vermelhos(Pv): os pigmentos vermelhos foram quantificados indiretamente com base em medidas de absorbância, (Beckman, U530) sob λ 495nm, usando meio filtrado através de membrana de éster de celulose 1,2 μm .

Velocidade específica de produção dos pigmentos vermelhos (μ_p): A partir do balanço material para o produto considerando-se nula a concentração de pigmento no meio de alimentação ($P_{e0}=0$) obtêm-se a equação (1) utilizada para o cálculo da velocidade específica da produção de pigmentos vermelhos.

$$\mu_p = \frac{Pv.D}{X} \quad (1)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manutenção da homogeneidade no biorreator é particularmente dificultosa quando do cultivo de fungos filamentosos. Para o estabelecimento do estado estacionário foi mantido o volume constante mediante controle da massa do conjunto biorreator e seus controles. A macro utilizada para a manutenção do volume acionava a bomba de saída se a massa do sistema de cultivo (biorreator e meio) fosse 100g. Desta forma, a saída de meio deu-se de modo intermitente (aproximadamente a cada 100ml - 2,5% do volume útil do biorreator) sob elevada vazão, $F > 1L.h^{-1}$, exercida por bomba de deslocamento positivo e foi uma das condições determinantes para a manutenção da homogeneidade do efluente e conseqüentemente estabelecimento do estado estacionário.

A freqüência de agitação de 700rpm favoreceu a predominância de hifas dispersas, evitando, por conseguinte, a aglomeração de células, o que poderia causar entupimento à saída do efluente.

A Figura 1 apresenta os resultados do ensaio.

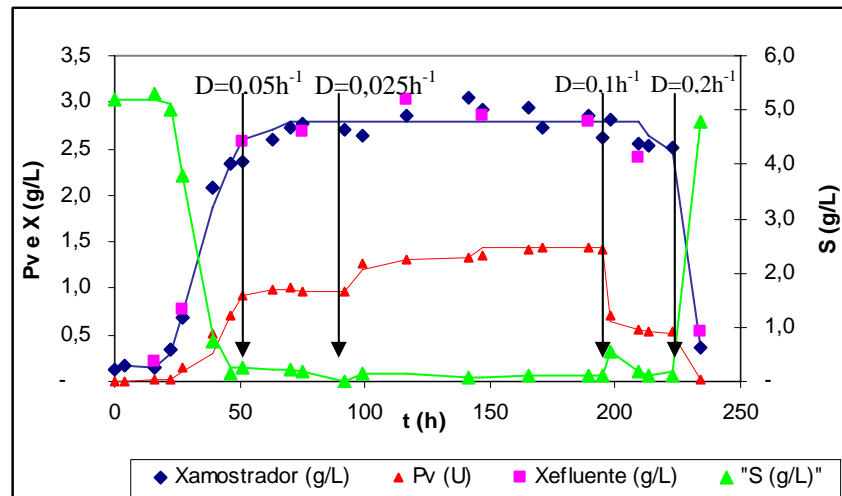


Figura 1: Concentração celular (X), concentração celular no efluente (X_{efluente}), concentração de glicose (S) e absorvância de pigmentos vermelhos (Pv) em função do tempo (ensaio contínuo).

A concentração celular, X , determinada nas amostras retiradas do seio do meio apresenta valores que representam cerca de 95% dos valores determinados para as amostras obtidas no efluente do sistema contínuo (X_{efluente}), fortalecendo a hipótese de ocorrência de homogeneidade.

Observa-se que a concentração de substrato (glicose) permaneceu entre 0 e 0,2 $g.L^{-1}$. Houve uma elevação deste valor para 0,5 $g.L^{-1}$ na fase de transição para a última condição

executada, devido ao aumento da vazão específica de alimentação aplicada para obtenção do valor de D de $0,2h^{-1}$.

A Tabela 2 apresenta os valores de velocidade específica de crescimento em cada estado estacionário do ensaio contínuo, concentração celular, absorvância para o pigmento vermelho, produção específica e velocidade específica de produção determinada pela equação (1).

Tabela 2: Velocidade específica de crescimento, concentração celular, produção (pigmento vermelho extracelular) e velocidade específica de produção, no diferentes estados estacionários do ensaio contínuo.

$t/\Delta t^*$	μ (h^{-1})	X ($g.L^{-1}$)	Pv (U)	μ_p ($U.L.g^{-1}.h^{-1}$)
0,68	0,025	2,8	1,42	0,013
0,75	0,025	2,9	1,44	
0,97	0,025	2,9	1,50	
0,63	0,05	2,7	0,98	0,017
1	0,05	2,8	0,97	
0,81	0,10	2,7	0,60	0,022
0,92	0,10	2,7	0,61	

* razão entre tempo decorrido do estado estacionário e tempo total de residência utilizado.

Os dados da Tabela 2 ilustram a condição de estado estacionário no ensaio contínuo, uma vez que os valores de X e P, determinados em duplicata ou triplicata ao longo de cada um dos estados estacionários, apresentam diferenças não superiores a 12%.

A viabilidade celular, determinada por meio de análise de imagens fluorescentes, é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Viabilidade celular média (%), produção específica de pigmento vermelho (Pe) e produção específica de pigmento vermelho das células viáveis (Pe viáveis).

	1°cond	2°cond	3°cond
D (h^{-1})	0,05	0,025	0,1
Viabilidade média (%)	81	68	91
Pe ($U.g^{-1}.L$)	0,35	0,51	0,22
Pe viáveis ($U.g^{-1}.L$)	0,41	0,70	0,24

A viabilidade celular está diretamente relacionada à velocidade específica de crescimento, de tal forma que para os menores valores de μ , observam-se os menores valores de viabilidade celular. Desta forma, a condução do processo sob valores de μ , significativamente inferiores ao valor de $\mu_{máx}$, se por um lado resulta células mais produtivas, por outro lado, promove o aumento da fração de células inviáveis.

A correção dos valores de produção específica em função da viabilidade celular, isto é, considerando-se apenas as células viáveis, resulta valores até 30% maiores.

Para a observação de diferenças nas formas e dimensões do micélio em função de μ , foram determinados parâmetros da micromorfologia, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Vazão específica, comprimento médio de hifas, grau de ramificação e porcentagem de clumps, nas três condições de estado estacionário.

	1ºcond	2ºcond	3ºcond
D (h^{-1})	0,05	0,025	0,1
L (μm)	135,1	155,3	130,7
N	6,3	9,8	4,1
N/L (μm^{-1})	0,051	0,074	0,030
Clumps (%)	52,6	70,1	41,1

Verificou-se que a redução do valor de μ desde 0,1 até 0,025, resultou aumento do comprimento (L) e do grau de ramificação (N/L), provavelmente devido à crescente limitação pelo substrato. Essas alterações de forma resultaram diferenças visíveis a olho nu, no aspecto da massa celular, conforme ilustram as Figuras 4.2 (a) e (b), as quais correspondem às imagens do micélio filtrado, obtido nas fases descontínua e contínua sob $D=0,025h^{-1}$.

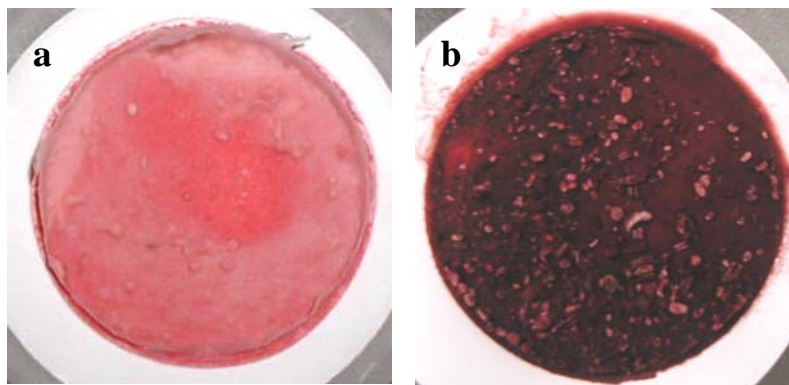


Figura 2: Micélio filtrado, obtido de amostras das fases descontínua (a) e contínua sob $D=0,025h^{-1}$ (b).

Comparando as Figuras 4.2 (a) e (b) fica evidente a distinta produção de pigmentos e a diferença morfológica das duas amostras. A diferença morfológica pode ser atribuída à maior frequência de *clumps* na amostra obtida sob μ de $0,01h^{-1}$, a qual, provavelmente, é conseqüência do maior grau de ramificação (N/L) que favorece o agrupamento do micélio, inclusive na forma de *pellets*, cuja frequência é maior na imagem (b) em comparação a imagem (a). Assim, é possível inferir que o aumento do grau de ramificação com conseqüente aglomeração do micélio está diretamente relacionado à limitação em glicose.

CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer o estado estacionário, em cultivo contínuo de *Monascus purpureus* ATCC 36928, devido à manutenção da homogeneidade, utilizando-se de alta frequência de agitação (700rpm) para a dispersão das hifas e sobretudo com o desenvolvimento de uma macro para o controle da massa do sistema de cultivo (biorreator e meio) específica, cuja retirada do meio deu-se de forma intermitente (2,5% do volume útil do biorreator).

O menor valor de vazão específica (D) adotado, o qual corresponde a 16,7% do valor da velocidade específica máxima de crescimento ($0,15h^{-1}$), levou a uma redução em torno de 32% na viabilidade celular.

A produção específica de pigmento vermelho de células viáveis foi cerca de 35% maior do que na situação de maior D ($0,1 h^{-1}$) aplicado, assim, a produção específica foi maior na condição de menor m aplicado e de menor viabilidade celular identificada.

O crescimento sob limitação da fonte de carbono e energia (glicose), induziu aumento do grau de ramificação das hifas, o que intensificou a aglomeração das células, evidenciada pelo aumento de cerca 1,5 vezes na frequência de *clumps*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bocking, S. P.; Wiebe, M. G.; Hansen, K.; Christiansen L. H.; Trinci A. P. J. (1999) Effect of branch frequency in *Aspergillus oryzae* on protein secretion and culture viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, v.35, p.820-830.

Corona, P. L; F. Isunza, L; González, G. V. (1997) Morfometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* growth in agar plates at high glucose levels" *Biotechnology & Bioengineering*, 56, 287-294.

Kim, H., J.; Kim, J., H.; Oh, H., J.; Shin, C., S. (2002) Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. *ProcessBiochemistry*, v. 38, p 649-655.

Mcintyre M, Muller C, Dynesen J, Nielsen J (2001) Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73: 103-128.

Moroviján, G.; Szakács, G.; Fekete, J. (1997) Monitoring of selected and biotransformation products from fermentation broths by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. v. 763, p.165-172.

Muller C, McIntyre M, Hansen K, Nielsen J (2002) Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1827-1836.

Nielsen J. (1992) A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, p. 715-727.

Olsvik, E.S. And Kristiansen, B., (1994) Rheology of Filamentous Fermentations, *Biotechnol. Adv.* 12, 1.

Patnaik, Debasis And Khurana, Paramjit (2001) Wheat biotechnology: A minireview. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.:4, p.12,.

Znidarsic, P.; Pavko, A. (2001) The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter *Food Technol. Biotechnol.* v. 39, p.:237-252.