

Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de corante por *Clonostachys rosea* P2SO329

Influence of carbon and nitrogen sources on the production of dye by *Clonostachys rosea* P2SO329

DOI: 10.34188/bjaerv6n3-075

Recebimento dos originais: 05/05/2023

Aceitação para publicação: 30/06/2023

Luciana Aires de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Bionorte, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil
airesluciana01@gmail.com

Walter Oliva Pinto Filho Segundo

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Bionorte, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil
waltsegundo@gmail.com

Ana Cláudia Alves Cortez

Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil
accortez@inpa.gov.br

Érica Simplicio de Souza

Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil,
ericasimpliciosouza@yahoo.com.br

João Vicente Braga de Souza

Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil
joaovicentebragasouza@yahoo.com.br

RESUMO

Corantes naturais são aqueles oriundos de plantas, algas, animais, bactérias e fungos. A grande maioria desses compostos não são tóxicos e de fácil degradabilidade. Além de apresentarem atividades biológicas interessantes. A produção de colorantes por fungos pode ser influenciada pela composição do meio de cultura. As necessidades nutricionais variam para cada micro-organismo e a atividade metabólica dos mesmos está diretamente relacionada com a escolha dos nutrientes. É fundamental conhecer as exigências nutricionais e controlar os componentes que possam reprimir o desenvolvimento do micro-organismo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de corante por *Clonostachys rosea* P2SO329. O isolado fúngico foi obtido de amostras de solo Amazônico. A espécie foi identificada pelo sequenciamento da região espaço interno transcrito (ITS) do DNAr. Foram realizados experimentos univariados a fim de verificar a influência de cinco fontes de carbono (sacarose, glicose, amido de milho, maltose e carboximetilcelulose - CMC) e quatro fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, sulfato de amônio, peptona e extrato de levedura). A maior produção do corante foi alcançada utilizando sacarose, glicose, amido e extrato de levedura. *Clonostachys rosea* P2SO329 é um potencial produtor de colorantes. Os esforços para encontrar novas fontes de produção desses compostos devem continuar, a fim de erradicar os corantes sintéticos tóxicos atualmente presentes nos produtos e que também são agentes de poluição do meio ambiente.

Palavras-chave: Amazônia, meio de cultivo, nutrientes, pigmento

ABSTRACT

Natural dyes are those derived from plants, algae, animals, bacteria, and fungi. Most of these compounds are non-toxic and easily degradable, in addition to presenting interesting biological activities. The production of dyes by fungi can be influenced by the composition of the culture medium. Nutritional requirements vary for each microorganism, and their metabolic activity is directly related to the choice of nutrients. It is essential to understand the nutritional requirements and control components that may suppress the development of the microorganism. This study aimed to assess the influence of carbon and nitrogen sources on the production of dye by *Clonostachys rosea* P2SO329. The fungal isolate was obtained from samples of Amazonian soil. The species was identified by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA. Univariate experiments were conducted to investigate the influence of five carbon sources (sucrose, glucose, corn starch, maltose, and carboxymethyl cellulose - CMC) and four nitrogen sources (sodium nitrate, ammonium sulfate, peptone, and yeast extract). The highest dye production was achieved using sucrose, glucose, starch, and yeast extract. *Clonostachys rosea* P2SO329 is a potential producer of dyes. Efforts to find new sources to produce these compounds should continue to eliminate toxic synthetic dyes currently present in products and that also contribute to environmental pollution.

Keywords: Amazon, culture medium, nutrients, pigment.

1 INTRODUÇÃO

Corantes naturais são aqueles oriundos de plantas, algas, animais, bactérias e fungos. A grande maioria desses compostos não são tóxicos e de fácil degradabilidade. Além de apresentarem atividades biológicas interessantes (antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antimutagênica, entre outras). Estes compostos naturais vêm despertando diversos interesses biotecnológicos nos últimos anos devido os relatos de toxicidade dos colorantes sintéticos atualmente presentes no mercado [1,2].

A produção de colorantes de origem fúngica incluem crescimento em substratos simples e de baixo custo, exigência de pequenos espaços mesmo para produções em larga escala e independência das condições climáticas. A extração e obtenção do produto final é facilitada pelo método de fermentação microbiana, além da possibilidade de redução dos custos de produção através da otimização das condições de cultivo [3,4].

A produção de colorantes por fungos pode ser influenciada pela composição do meio de cultura [5]. As necessidades nutricionais variam para cada micro-organismo e a atividade metabólica dos mesmos está diretamente relacionada com a escolha dos nutrientes. Buscando uma maior produtividade, é necessária uma eficiente conversão do substrato no produto de interesse. Para isto, é fundamental conhecer as exigências nutricionais e controlar os componentes que possam reprimir o desenvolvimento do micro-organismos [6,7].

O estudo de compostos produzidos por fungos do solo Amazônico também é de grande contribuição para o conhecimento e desenvolvimento da região. Por isso, o presente estudo teve

como objetivo avaliar a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de corante por *Clonostachys rosea* P2SO329 (um isolado do solo Amazônico).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e identificação do isolado Clonostachys rosea P2SO329

Foi utilizado nesse estudo o isolado fúngico *Clonostachys rosea* P2SO329 obtido de amostras de solo Amazônico. A amostra foi coletada na zona florestal localizada na Reserva Biológica de Campina (2°35'19,19"S, 60° 1'59,91"O) Manaus, Brasil. Para o isolamento, foi utilizado o método de diluição seriada (1×10^{-1} - 1×10^{-3}). 0,1 ml de suspensão foi adicionado a placas de petri estéreis em duplicatas contendo Ágar Sabouraud estéril empregando a técnica de espalhamento. As placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 5-7 dias.

A espécie foi identificada pelo sequenciamento da região espaço interno transcrito (ITS) do DNAr. O DNA fúngico foi extraído do micélio pelo método fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico [8]. Reações de PCR foram realizadas utilizando os primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [9]. O sequenciamento foi realizado no Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram analisadas pelo BioEdit Sequence Alignment Editor e comparadas com as do banco de dados GenBank.

Efeito dos parâmetros nutricionais na produção do corante

Os bioprocessos submersos foram realizados tendo como meio base caldo Czapeck. Foram realizados experimentos univariados a fim de verificar a influência de cinco fontes de carbono (sacarose, glicose, amido de milho, maltose e carboximetilcelulose - CMC) e quatro fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, sulfato de amônio, peptona e extrato de levedura). Em cada experimento, apenas a fonte de carbono (30g/L) ou a fonte de nitrogênio (3g/L) foram modificadas separadamente. Uma suspensão de esporos (10^4 células/mL) foi inoculada em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de cada respectivo meio de cultivo. A produção do corante foi estimada pela análise da absorvância máxima (λ_{max}) por varredura (400 nm a 700 nm) no espectrofotômetro UV/VIS em acetato de etila [10].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

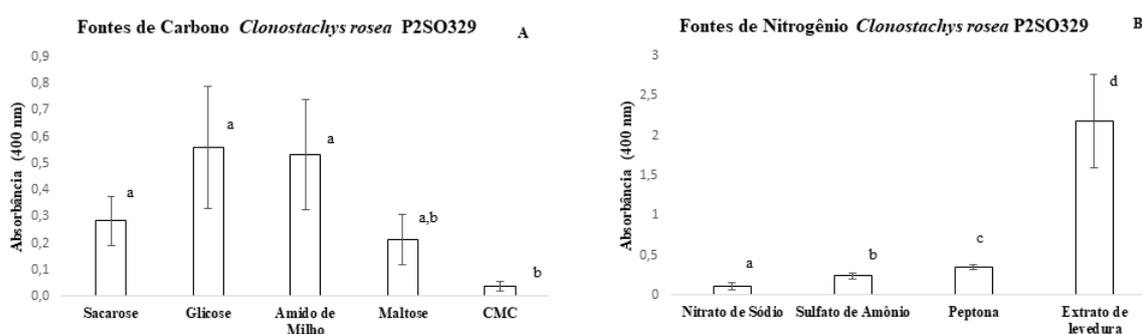
As sequências obtidas por meio de sequenciamento da região ITS do rDNA foram analisadas por bioinformática e comparadas com as do banco de dados GenBank e exibiram 99% de

similaridade com *Clonostachys rosea* (Acesso MN452057.1). Portanto, o isolado do presente trabalho foi designado *Clonostachys rosea* P2SO329.

O isolado *C. rosea* P2SO329 exibiu a produção de um colorante de tonalidade amarelo. O colorante foi submetido a determinação de sua absorvidade máxima (λ_{max}) na região entre 400–700 nm. Os dados de varredura mostraram que o mesmo apresentou absorvância máxima em 400 nm.

A maior produção do corante (400 nm) foi alcançada utilizando sacarose, glicose ($0,6 \pm 0,2$ UA), e amido ($0,5 \pm 0,2$ UA) como fonte de carbono (Figura 1A). Extrato de levedura ($2,1 \pm 0,5$ UA) foi a fonte de nitrogênio que permitiu as maiores absorvâncias para a cepa em estudo (Figura 1B).

Figura 1: Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de corante amarelo por *Clonostachys rosea* P2SO329. Letras diferentes representam diferenças significativas de acordo com o teste t-Sudent ($p < 0,05$).



Cerca de 50% de carbono e 10% de nitrogênio compõem a massa de células dos micro-organismos. Portanto, a regulação e expressão dos genes responsáveis pela produção de colorantes são diretamente influenciadas pelas fontes de carbono e nitrogênio escolhidas. A glicose tem sido descrita como um excelente nutriente para estimular o crescimento celular. [6,11]. Extrato de levedura mostrou ser mais favoráveis para a produção de corantes vermelho, amarelo e laranja pela cepa *Penicillium purpurogenum* DPUA1275 [12]. *Fusarium moniliforme* KUMBF1201, um isolado do solo teve uma maior eficiência na produção de pigmento ao utilizar extrato de levedura como fonte de nitrogênio [13].

4 CONCLUSÕES

Nossos achados evidenciam que *Clonostachys rosea* P2SO329 é um potencial produtor de colorantes. Os esforços para encontrar novas fontes de produção desses compostos devem continuar, a fim de erradicar os corantes sintéticos tóxicos atualmente presentes nos produtos e que também são agentes de poluição do meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento da pesquisa no âmbito da Chamada Universal FAPEAM-006/2019.

REFERÊNCIAS

- [1] SIGURDSON, G.T; TANG, P; GIUSTI, M.M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Ann Rev Food Sci Technol**, 8:261–80, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923>.
- [2] YUSUF, M; SHABBIR, M; MOHAMMAD, F. Natural Colorants: Historical, processing and sustainable prospects. **Nat Products Bioprospect**, 7:123–45, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0119-9>.
- [3] MALIK, K; TOKKAS, J; GOYAL, S. Microbial Pigments: a review. **International Journal of Microbial Resource Technology**, 361–5, 2012.
- [4] LOPES, F.C; TICHOTA, D.M; SAUTER, I.P; MEIRA, S.M.M; SEGALIN, J; ROTT, M.B, et al. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. **Ann Microbiol**, 63:771–8, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0532-6>.
- [5] MEINICKE, R. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. 2008.
- [6] CHATTERJEE, S; MAITY, S; CHATTOPADHYAY, P; SARKAR, A; LASKAR, S; SEM, S.K. Characterization of red pigment from *Monascus* in submerged culture red pigment from *Monascus Purpureus*. **J Appl Sci Res**, 5:2102–8, 2009.
- [7] SHI, K, SONG, D; CHEN, G; PISTOLOZZI, M; WU, Z; QUAN, L. Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. **J Biosci Bioeng**, 120:145–54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.001>.
- [8] FERRER, C; COLOM, F; FRASÉS, S; MULET, E; ABAD, J.L; ALIÓ, J.L. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **J Clin Microbiol**, 39:2873–9, 2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2873-2879.2001>.
- [9] WHITE, T. J; BRUNS, T; LEE, S; TAYLOR JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protoc. A Guid. to methods Appl., San Diego: **Academic Press**; 1990, p. 315–22.
- [10] CELESTINO, J.D.R, CARVALHO, L.E; DE LIMA, M.D.P; LIMA, AM; OGUSKU, M.M; SOUZA, J.V.B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochem**, 49:569–75, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014>.
- [11] CARVALHO, J. C. M; MATSUDO, M. C; BEZERRA, R. P; SATO S. Tecnologia de fermentações. Biotecnol. Farm. **Asp. sobre Apl. Ind.**, 2015, p. 111–2.
- [12] Santos-Ebinuma, V.C. Produção e extração de colorantes naturais de *Penicillium*. 2013.
- [13] PRADEEP, F.S; BEGAM, M.S; PALANISWAMY, M; PRADEEP, B.V. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. **World Applied Sciences Journal**, 22:70–7, 2013.