

AVALIAÇÃO DO USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA POR *Janthinobacterium* sp.

Palavras-Chave: biotecnologia, biocolorantes, fermentação submersa, pigmentos azuis

Autores(as):

Gabriel Henrique Barboza, FEA - UNICAMP

Simone Aparecida de Lima Scaramussa, FEA - UNICAMP

Prof. Dr. JULIANO LEMOS BICAS, FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A crescente demanda por produtos mais sustentáveis e saudáveis tem impulsionado a busca por alternativas naturais aos corantes sintéticos, amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além de conferirem coloração, pigmentos naturais podem apresentar propriedades bioativas, como ação antimicrobiana e antioxidante, o que tem expandido suas possíveis aplicações. O mercado global de corantes naturais já representa a maior parte da receita do setor, com projeção de atingir US\$6,09 bilhões até 2030 (CHAUDHARY, 2024).

Os corantes obtidos por via biotecnológica destacam-se por normalmente serem mais estáveis que os de origem sintética e por oferecerem vantagens como controle das condições de produção, rendimentos otimizados, extração facilitada e um possível menor impacto ambiental. Entre eles, a violaceína — um pigmento azul-púrpura produzido por bactérias como *Chromobacterium violaceum* e *Janthinobacterium* sp. — é notável pela sua coloração vibrante e suas diversas bioatividades, incluindo efeitos antimicrobianos, anticancerígenos e fotoprotetores (DÚRAN et al., 2021; PARK et al., 2021). Sua aplicação potencial abrange as indústrias cosmética, têxtil e alimentícia, embora seu uso em larga escala ainda enfrente desafios devido à limitação de dados toxicológicos, bem como ao alto custo e à necessidade de otimização dos processos de produção.

Nesse contexto, o uso de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de violaceína surge como uma estratégia promissora para reduzir custos e promover a sustentabilidade. Diversos resíduos, como farelos de trigo e soja, melaço, bagaço de cana e resíduos de abacaxi, já foram investigados como fontes alternativas de carbono e nitrogênio para a produção de violaceína por fermentação (CASSARINI et al., 2022; ARULDASS et al., 2015). A valorização desses subprodutos não apenas diminui os impactos ambientais, mas também contribui para a economia circular, transformando resíduos em produtos de alto valor agregado.

Desta forma, o presente trabalho visa avaliar a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para a produção de violaceína, com foco na otimização da relação C:N (carbono-nitrogênio) dos meios de cultivo. Para tal, baseando-se na melhor relação C:N de meios de cultivos comerciais, foram ajustadas as formulações dos resíduos e subprodutos industriais, visando atingir a relação ideal obtida anteriormente e avaliar a produção do pigmento nestes substratos.

METODOLOGIA:

Inicialmente, as condições de cultivo foram otimizadas em meios comerciais compostos por extrato de levedura (fonte de nitrogênio - N) e frutose (fonte de carbono - C). Conforme previamente avaliado por Ishimoto et al. (2024), as condições de cultivo iniciais adotadas no presente estudo foram: meio de cultivo “Y5F” (5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de frutose), com incubação a 18°C e 200 rpm. A relação C:N do meio Y5F foi calculada com base na composição dos substratos (frutose: ~40% C e 0% N; extrato de levedura: ~40% C e 10% N), resultando em uma proporção C:N aproximada de 12:1 e com uma concentração total de 6 g/L de carbono.

A partir deste meio, realizou-se o cultivo em combinações de variadas relações C:N (4:1, 12:1 e 36:1) e concentrações total de carbono (3, 6 e 12 g/L), totalizando nove formulações, visando identificar a melhor composição do meio para a produção da violaceína com variadas quantidades de frutose e extrato de levedura.

Para o cultivo, inicialmente a bactéria *Janthinobacterium* sp. foi repicada em ágar nutriente (25°C, 24 h), seguido da obtenção do inóculo em caldo nutriente a partir da transferência de uma alçada de células e incubação a 18°C, 200 rpm, 12 h, até obtenção de um valor de densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 3,0. A inoculação nos meios de cultivo foi realizada utilizando-se 1% v/v do inóculo, e o cultivo realizado com incubação a 18°C e 200 rpm, por 144 h. Após o tempo de cultivo, o teor de biomassa foi determinado por OD₆₀₀ (diluição 1:10), e a biomassa rica em violaceína foi recuperada de 5 mL do meio por centrifugação (3600 rpm, 15 min), seguindo-se de extração com 5 mL de etanol absoluto e com agitação em vórtex a 3000 rpm por 1 min. A quantificação da violaceína no extrato alcoólico foi feita por espectrofotometria a 575 nm, utilizando curva de calibração (1–12,5 mg/L, violaceína de grau analítico, Sigma-Aldrich, Alemanha. CAS n° 548-54-9, pureza >98%, violaceína (mín. 85%) e deoxiviolaceína).

Partindo da condição otimizada no primeiro conjunto de experimentos (C:N 12:1 e 6 g/L de carbono total), foram realizadas formulações substituindo parcialmente a frutose e o extrato de levedura por resíduos agroindustriais. O teor de carbono e nitrogênio desses resíduos foi determinado pelo método de Dumas (Truspec CN, Embrapa Meio Ambiente), e, com esses dados, ajustaram-se as formulações para manter a proporção C:N de 12:1, suplementando-se com frutose ou extrato de levedura conforme necessário, considerando 50 mL de meio de cultivo e realizando a correção da umidade dos resíduos para base seca. A composição do meio dos resíduos foi organizada conforme a tabela a seguir.

Tabela 1. Resíduos testados e as quantidades de frutose e extrato de levedura adicionados para atingir meios com uma relação C:N de 12:1 e 6g/L de carbono.

Resíduo	Relação C:N (resíduo)	Qnt. Resíduo (g/L)	Qnt. Frutose (g/L)	Qnt. Extrato de Levedura (g/L)
Amido de ervilha	15:1	14,62	-	1,27
Casca de cacau	18:1	12,66	-	2,36
Fibra de cítricos	50:1	9,82	-	4,34
Farinha de casca de camarão	15:1	13,42	-	1,5
Extrato Protéico	4:1	4,36	10,16	-
Farinha de soja	8:1	8,64	4,52	-

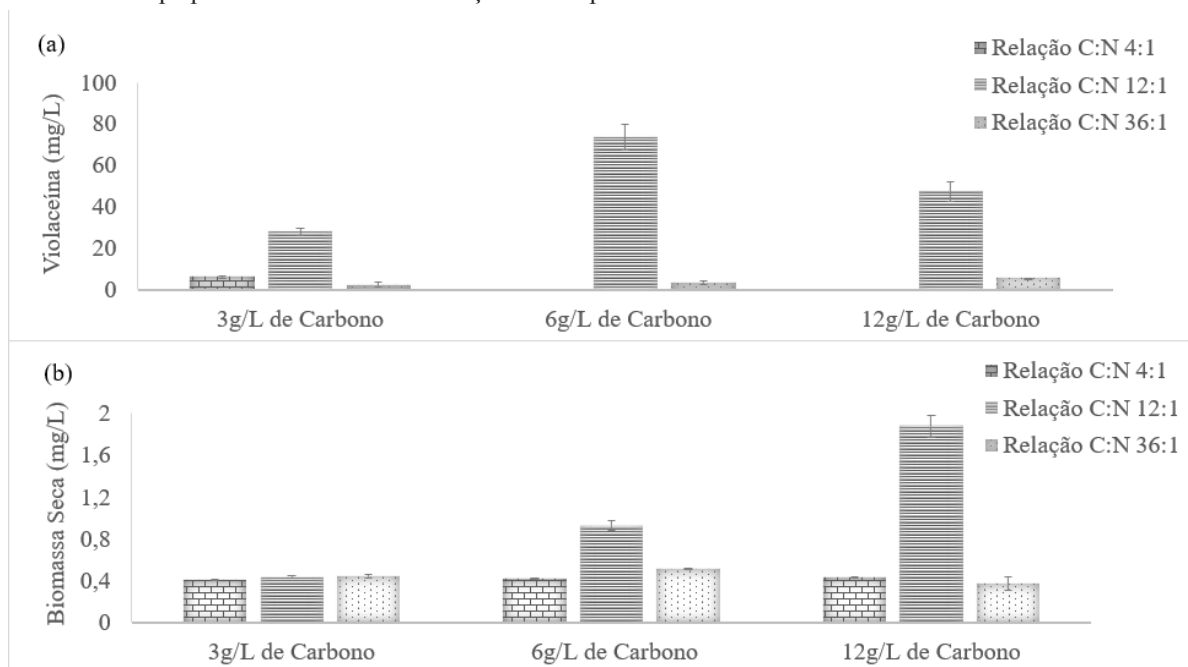
Casca de banana	37:1	11,32	-	3,98
Extrato Hilyses	37:1	11,4	-	3,98
Purê de batata	27:1	42,74	-	3,42
Casca de batata	28:1	62	-	3,52

Fonte : Autores (2025)

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os ensaios de produção de violaceína utilizando meio comercial à base de frutose e extrato de levedura, em diferentes razões C:N, resultaram em variações nas concentrações do pigmento (Figura 1a). A Figura 1b mostra a concentração de biomassa seca obtida nas mesmas condições.

Figura 1. concentração de violaceína (mg/L) (a) e estimativa de concentração de biomassa (mg/L) (b) produzida pela *Janthinobacterium* sp após 144 horas de fermentação à 200 rpm e 18°C.



Fonte : Autores (2025)

Conforme pode ser percebido pela análise do gráfico, a melhor produção de violaceína foi obtida para a condição de relação C:N 12:1 e 6 g/L de carbono, o que resultou em uma concentração final de violaceína de $72,8 \pm 9,2$ mg/L. Esta condição é justamente a mais próxima da formulação de meio otimizada por Ishimoto et al. (2024) (relação C:N de aproximadamente 12:1 com uma concentração total de carbono de aproximadamente 6 g/L). Contudo, a concentração final de violaceína foi menor do que a anteriormente reportada (Ishimoto et al., 2024) em condições próximas, que foi de $113,68 \pm 16,68$ mg/L. Dentre possíveis motivos para a divergência dos valores pode-se citar os erros relativamente altos associados a bioprocessos, além de que as condições são semelhantes, mas não idênticas.

Após a determinação das condições ideais de razão C:N (12:1) e carbono total (6 g/L) para maior produção de pigmento, a formulação contendo os resíduos foi ajustada para essa mesma proporção, mantendo as mesmas condições descritas para as formulações comerciais. Os resultados obtidos indicam que a maioria dos meios formulados com resíduos não resultou em produção de violaceína, exceto para os quatro casos apresentados na Figura 2.

Os meios de cultivo formulados separadamente com amido de ervilha, casca de cacau, purê de batata e casca de batata (resíduos industriais), extrato de levedura Hilyses e casca de banana apresentaram apenas um leve crescimento bacteriano (meios visualmente turvos), porém não houve produção visível de violaceína. Por esse motivo, não foi realizada a extração e quantificação de violaceína nessas amostras.

Entre os possíveis motivos para a ausência de pigmentação estão a presença de carboidratos complexos nesses resíduos, como amido, celulose, hemicelulose, oligossacarídeos e polissacarídeos, que podem ser de difícil acesso e metabolização pela bactéria, limitando a disponibilidade de açúcares fermentáveis para o crescimento microbiano (MAJUNDER et. al, 2022). Além disso, muitos desses substratos podem conter compostos bioativos com atividade antimicrobiana, tais como fenóis, taninos, flavonoides e alcaloides, que podem inibir o crescimento microbiano ou interferir no metabolismo bacteriano, dificultando o desenvolvimento da biomassa e a produção do pigmento (SANTOS et. al, 2024; KAPADIA et. al, 2015).

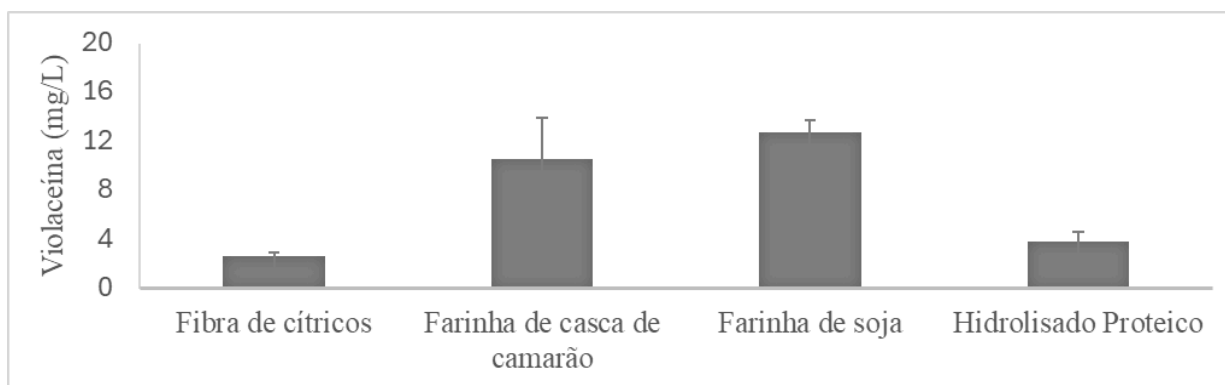
Dentre os possíveis fatores associados à produção de violaceína observada nos meios contendo farinha de casca de camarão, farinha de soja e hidrolisado proteico, destaca-se o fato de serem fontes ricas em nitrogênio (LIU et al 2017; ROSSI et al 2024). Considerando que a violaceína é sintetizada a partir do aminoácido L-triptofano, a presença de substratos que liberam

aminoácidos acessíveis no meio de cultivo é importante para a ativação da via metabólica de produção do pigmento, o que pode justificar a pigmentação observada nessas formulações.

Já entre os resíduos utilizados como fonte de carbono, a casca de batata, o purê de batata, a casca de banana, a casca de cacau e o amido de ervilha, não resultaram em produção da violaceína, sendo a fibra de cítricos o único subproduto que, quando suplementado com extrato de levedura, conseguiu gerar pigmentação. Um dos motivos para isso pode ser a maior presença de açúcares solúveis e biodisponíveis na fibra de cítricos, como na casca da laranja, enquanto nos outros resíduos os açúcares estão mais complexados e menos acessíveis para o microrganismo (WILKINS et. al, 2017).

De acordo com os resultados do experimento, a suplementação de frutose com farinha de soja resultou na maior produção de violaceína, em torno de 13 mg/L. Em contrapartida, dados presentes na literatura indicam que o meio contendo 1 g/100 mL de farinha de soja alcançou um valor de 373 mg/L, com aproximadamente 115 horas de fermentação e sem suplementação de triptofano (GOHIL et. al, 2022). Contudo, a cepa utilizada neste estudo foi a *Chromobacterium violaceum*, o que pode ter influenciado a variação na produção do pigmento, juntamente com as diferentes condições do experimento, visto que a incubação foi realizada a 37 °C com agitação de 150 rpm por 48 horas. Além disso, possíveis diferenças no lote e no processamento da farinha de soja, assim como no perfil de composição do resíduo utilizado, também se apresentam como fatores que podem justificar a diferença de concentração encontrada.

Figura 2. Concentração de violaceína (mg/L) produzida pela *Janthinobacterium sp* após 144 horas de fermentação à 200 rpm e 18°C.



Fonte : Autores (2025)

CONCLUSÕES:

Os resultados demonstraram que, embora o meio formulado apenas com frutose e extrato de levedura tenha proporcionado maior produção do pigmento, os meios formulados com resíduos agroindustriais (mantendo a mesma relação C:N e concentração de carbono previamente otimizadas) também foram capazes de sustentar o crescimento microbiano e a biossíntese da violaceína, ainda que em níveis inferiores.

Essa diferença na produção pode ser atribuída a fatores intrínsecos aos resíduos utilizados, como a complexidade na biodisponibilidade dos nutrientes presentes nesses substratos, a possível presença de compostos antimicrobianos, além da variabilidade natural na composição desses subprodutos, o que pode limitar a eficiência metabólica da violaceína quando comparados a substratos comerciais mais padronizados.

Ainda assim, o uso de resíduos agroindustriais se mostrou uma possibilidade ambientalmente sustentável e alinhada aos princípios de uma bioeconomia circular, reduzindo custos com insumos e promovendo o aproveitamento de materiais que seriam descartados. Esses resultados reforçam o potencial dos resíduos como matéria-prima para a produção de violaceína, sobretudo em contextos de bioprocessos de baixo custo e foco ecológico.

Recomenda-se, portanto, a realização de novos estudos aprofundados com diferentes tipos de resíduos, incluindo subprodutos ainda pouco explorados pela literatura para a produção da violaceína, como a milhocina e demais resíduos ou subprodutos líquidos agroindustriais, com o objetivo de otimizar a produção do pigmento.

BIBLIOGRAFIA

- ARULDASS, C. A.; RUBIYATNO; VENIL, C. K.; AHMAD, W. A. Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. *RSC Advances*, v. 5, n. 64, p. 51524–51536, 2015.
- CASSARINI, M.; CRÔNIER, D.; BESAURY, L.; RÉMOND, C. Protein-Rich Agro-Industrial Co-products are Key Substrates for Growth of *Chromobacterium vaccinii* and its Violacein Bioproduction. *Waste and Biomass Valorization*, 2022.
- CHAUDHARY, Tejas. Food Color Market Research Report Information By Source (Natural and Synthetic), By Application (Bakery & Confectionery, Dairy & Frozen Desserts, Beverages, Sweet & Savory Snacks, and Meat Products), And By Region (North America, Europe, Asia-Pacific, And the Rest Of The World) – Market Forecast Till 2030. *Market Research Future*, [S.l.], 2024.
- DURÁN, N. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein – its main secondary metabolite: a review. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 2016.
- DURÁN, N.; JUSTO, G. Z.; MARTINS, D.; ESPÓSITO, B. P. Multi-target drug with potential applications: violacein in the spotlight. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [S.l.], v. 37, n. 6, p. 1–13, 2021.
- ISHIMOTO, Caroline Kie; PAULINO, Bruno Nicolau; NERI-NUMA, Iramaia Angélica; BICAS, Juliano Lemos. The blue palette of life: a comprehensive review of natural bluish colorants with potential commercial applications. *Food Research International*, v. 196, p. 115082, 2024.
- GOHIL, Nisarg; BHATTACHARJEE, Gargi; GAYKE, Manoj; NARODE, Hanuman; ALZAHIRANI, Khalid J.; SINGH, Vijai. Enhanced production of violacein by *Chromobacterium violaceum* using agro-industrial waste soybean meal. *Journal of Applied Microbiology*, v. 132, n. 2, p. 1121–1133, 2022.
- KAPADIA, Suraj Premal; PUDAKALKATTI, Pushpa S.; SHIVANAIKAR, Sachin. Detection of antimicrobial activity of banana peel (*Musa paradisiaca* L.) on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: an in vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*, v. 6, n. 4, p. 496–499, 2015.
- MAJUMDER, Esha; XAVIER, João Brás. Carbohydrate complexity limits microbial growth and reduces the sensitivity of human gut communities to perturbations. *Nature Ecology & Evolution*, v. 6, p. 1041–1054, 2022.
- LIU, Jiaheng; ZHOU, Jianjian; WANG, Lihong; MA, Zelin; ZHAO, Guangrong; GE, Zhiqiang; ZHU, Hongji; QIAO, Jianjun. Improving nitrogen source utilization from defatted soybean meal for nisin production by enhancing proteolytic function of *Lactococcus lactis* F44. *Scientific Reports*, v. 7, p. 6189, 2017.
- PARK, Hyuna; PARK, Seo A.; YANG, Yung-Hun; CHOI, Kwon-Young. Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, Abingdon, v. 41, n. 6, p. 879–901, 17 mar. 2021.
- ROSSI, Nicola; GROSSO, Clara; DELERUE-MATOS, Cristina. Shrimp Waste Upcycling: Unveiling the Potential of Polysaccharides, Proteins, Carotenoids, and Fatty Acids with Emphasis on Extraction Techniques and Bioactive Properties. *Marine Drugs*, v. 22, n. 4, p. 153, 2024.
- SANTOS, R. X.; OLIVEIRA, D. A.; SODRÉ, G. A.; GOSMANN, G.; BRENDL, M.; PUNGARTNIK, C. Atividade antimicrobiana do extrato fermentado de casca de vagem de *Theobroma cacao*. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 3, p. 7725–7735, 2014.
- WILKINS, Mark R.; WIDMER, Wilbur W.; GROHMANN, Karel. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 12, p. 1614–1619, 2007.