

Área: Engenharia de Alimentos

PARÂMETROS CINÉTICOS DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS MONASCUS UTILIZANDO CO-PRODUTOS DO BIODIESEL

**Rose Marie Meinicke Bühler, Bruna Luise Müller, Denise Esteves Moritz,
Jorge Luiz Ninow***

*Laboratório de Engenharia Bioquímica, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de
Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina*

**E-mail: jorge@enq.ufsc.br*

RESUMO

Pigmentos *Monascus* podem ser utilizados para a coloração de alimentos, substituindo os corantes sintéticos. Esses pigmentos podem ser produzidos por processos biotecnológicos em cultivos submersos utilizando glicose como substrato. Com o crescente aumento da disponibilidade do glicerol, que pode ser obtido como principal resíduo da obtenção do biodiesel, é importante estudar a utilização desse resíduo como substrato para a obtenção de moléculas de maior valor agregado, como os pigmentos *Monascus*. Nesse estudo foi observado que a glicerina bruta e a glicerina destilada obtidas de indústrias produtoras de biodiesel podem ser utilizadas como substratos para a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber*. Contudo, a glicose apresentou os melhores resultados para os parâmetros cinéticos: máxima produção de pigmentos vermelhos, produtividade de células e produtividade de pigmentos.

Palavras-chave: *Monascus ruber*, cultivo submerso, glicerina, biopigmentos.

1 INTRODUÇÃO

As cores são adicionadas aos alimentos, principalmente, para restituir a aparência original (afetada durante as etapas de processamento, de estocagem, de embalagem ou de distribuição), para tornar o alimento visualmente mais atraente (ajudando a identificar o aroma normalmente associado a determinados produtos), para conferir cor aos desprovidos de cor e para reforçar as cores presentes nos alimentos. A utilização de pigmentos naturais em alimentos tem aumentado recentemente devido às vantagens do marketing no

desenvolvimento de ingredientes naturais e devido à preocupação dos consumidores sobre efeitos prejudiciais dos pigmentos sintéticos à saúde (DUFOSSÉ, 2006).

Pigmentos naturais são derivados de fontes como plantas, insetos e microrganismos. Eles têm ganhado maior atenção devido à estabilidade dos pigmentos produzidos, a segurança, a possibilidade de produção e a avaliação da tecnologia para otimizar um maior rendimento (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

O uso de fungos filamentosos como fontes de corantes para alimentos têm um longo uso no Oriente, porém ainda são proibidos no Ocidente, exceto a produção bem sucedida de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea*. A maioria da literatura disponível sobre fungos produtores de pigmentos para alimentos fala sobre o *Monascus*, que produz pigmentos que são bons corantes devido à estabilidade na faixa de pH de 2 – 10, estabilidade ao calor à autoclavagem e por exibir diferentes cores (MAPARI et al., 2005).

O gênero *Monascus* envolve três principais espécies (*M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber*) pertencendo à família *Monascaceae* e à classe *Ascomyceta*, cuja maior característica é a habilidade para produzir metabólitos secundários de estruturas policetídicas com pigmentação amarela, laranja e vermelha (HAMDI et al., 1997).

Espécies de *Monascus ruber* produzem pigmento *Monascus* nos seguintes substratos: glicose, celobiose, maltose e frutose, mas não produzem este pigmento com a sacarose. Sendo que a glicose é o substrato mais utilizado e estudado, pois proporciona maior rendimento e produção de pigmentos. Devido ao alto custo da tecnologia empregada na produção de pigmentos em uma escala industrial, é necessário o desenvolvimento de processos de menor custo para que a produção dos pigmentos possa substituir a produção de sintéticos (BABITHA et al., 2006; JUZLOVÁ et al., 1996).

O alto custo na produção de corantes naturais pode ser minimizado usando resíduos orgânicos de baixo custo. Um substrato alternativo para a produção de pigmentos é a glicerina. A glicerina pode ser obtida como principal resíduo da produção de biodiesel. O biodiesel é um combustível produzido a partir de fontes totalmente renováveis, especialmente quando tem como suas matérias-primas etanol ou metanol e um óleo qualquer de origem vegetal ou animal. O crescente aumento na produção mundial de biodiesel gera um aumento considerável na disponibilidade da glicerina (cerca de 10 a 12% em relação à massa processada de óleos vegetais, por exemplo), podendo este ser purificado (FERNANDO et al., 2007).

Portanto, estudos sobre a utilização da glicerina em processos biotecnológicos, vem a ser interessantes, uma vez que esse resíduo se tornará um subproduto excedente quando o biodiesel for produzido em larga escala comercial (PAPANIKOLAOU et al., 2000; EASTERLING et al., 2009).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de pigmentos vermelhos, amarelos e laranja pelo fungo *Monascus ruber*. Foram pesquisados como substratos, resíduos de duas empresas de biodiesel que utilizam como matéria-prima o óleo de soja: glicerina bruta e glicerina destilada. Os resultados foram comparados com a produção de pigmentos utilizando a glicose, que é o principal substrato utilizado, e o glicerol sintético. Foram realizados cultivos submersos em frascos aletados.

A glicerina bruta, mesmo com suas impurezas convencionais, constitui um subproduto que pode ser comercializado. No entanto, o mercado é muito mais favorável à comercialização da glicerina purificada. Essa purificação pode ser feita por destilação a vácuo, resultando um produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802 mantido em tubos inclinados em ágar batata dextrose a 4°C. A partir dos tubos inclinados, o microrganismo foi multiplicado em garrafas de Roux contendo ágar batata dextrose.

O meio de cultivo estudado contendo em gramas por litro de água destilada foi composto de glicerina, 20; glicina, 5; K₂HPO₄, 5; KH₂PO₄, 5; CaCl₂, 0,1; MgSO₄.7H₂O, 0,5; FeSO₄.7H₂O, 0,01; ZnSO₄. 7H₂O, 0,01 e MnSO₄. H₂O, 0,03 (PASTRANA et al., 1995).

Foram realizados cinco cultivos contendo como fontes de carbono: 1) Glicose; 2) Glicerina bruta derivada da produção de biodiesel de óleo de soja da indústria 1; 3) Glicerina bruta derivada da produção de biodiesel de óleo de soja da indústria 2; 4) Glicerina destilada derivada da produção de biodiesel de óleo de soja da indústria 2; 5) Glicerol Sintético.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers aletados de 1000 mL contendo 360 mL de cada meio de cultivo e inoculado com 40 mL do inóculo de *Monascus ruber* e incubados em shaker orbital na temperatura de 30°C a uma frequência de 120 min⁻¹. O tempo de cultivo foi de 168 h. Uma amostra de 5 mL de cada cultivo foi retirada a cada 24 horas. O pH permaneceu em torno de 6,5 em todos os cultivos.

A biomassa foi quantificada mediante gravimetria, sendo uma quantidade (5 mL) do meio de cultivo filtrada em papel filtro Whatman previamente pesado e o material submetido à secagem em forno microondas durante 15 minutos em potência 2 (180 W) (HAMANO et al., 2005) obtendo-se a quantidade de biomassa retida em um volume de meio conhecido.

Os pigmentos foram quantificados em Unidades de Absorbância (UA) utilizando um espectrofotômetro SP-1100 Séries Modelo SP-105 nos seguintes comprimentos de onda: 510 nm (pigmentos vermelhos), 470 nm (pigmentos laranja) e 400 nm (pigmento amarelo) (HAJJAJ et al., 2000).

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) durante a fase exponencial foi calculada a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo.

A produtividade máxima em células ($P_{\text{células}}$) foi calculada pela diferença entre a maior concentração celular (biomassa) em um instante t e a concentração celular (biomassa) inicial dividida pelo intervalo de tempo correspondente. E a produtividade máxima de produção de pigmentos foi calculada pela diferença entre a maior concentração de pigmentos (UA) em um instante t e a concentração inicial de pigmentos dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de biomassa e produção de pigmentos em UA (Unidades de Absorbância) foram analisados. A maior formação de biomassa foi observada nos cultivos com glicerina destilada e glicerina bruta 2, em torno de 9 g/L. Para a produção de pigmentos, maiores valores de Absorbância (UA) foram observados para os cultivos com glicose (11 UA) seguido do cultivo com glicerina destilada, em torno de 9 UA (MEINICKE et al., 2010).

Ainda é conhecido que 1 unidade absorvância UA (Abs) corresponde a 15 mg/L de pigmento vermelho no meio de cultivo (HAJJAJ et al., 1998).

A Figura 1 apresenta a produção de pigmentos por *Monascus ruber* em frasco aletado contendo glicerina bruta como único substrato.



Figura 1 – Produção de pigmentos *Monascus* em frasco aletado utilizando como substrato a glicerina bruta.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos para os cultivos.

	A	B	C	D	E
	(Glicose)	(Glicerina Bruta 1)	(Glicerina Bruta 2)	(Glicerina Destilada)	(Glicerol)
μ (máx) h ⁻¹	0,0105	0,011	0,0161	0,0122	0,0257
P (células)	0,0508	0,0307	0,0625	0,0583	0,0399
PM Pig. Vermelhos	0,0727	0,0326	0,0393	0,0476	0,0255
PM Pig. Laranjas	0,0754	0,0316	0,0389	0,0488	0,0218
PM Pig. Amarelos	0,076	0,0321	0,0378	0,0477	0,026
Máxima produção de pigmentos vermelhos (UA)	11	6,3	7,6	9,2	3,8

Em ensaios com glicose e glutamato monossódico em frascos de 500 mL com diferentes cepas de *Monascus ruber*, Hamano et al. (2005) obtiveram produção de pigmentos variando de 8 a 20 UA, com máxima produção de biomassa de 6 g/L.

Pastrana et al. (1995) realizaram ensaios com glicose como substrato em frascos de 250 mL e obtiveram como máxima produção de pigmentos vermelho de 6 UA e 7 g/L de biomassa.

Em ensaios anteriores também em frascos de 1L, com glicerol sintético foi observada máxima produção de pigmentos vermelhos em torno de 7 UA e biomassa de 5 g/L. Para ensaios com glicose foi observada produção de 6 g/L de biomassa e 10 UA de pigmentos vermelhos (MEINICKE, 2008).

Hamdi et al. (1997) estudaram a produção de pigmentos por *Monascus purpureus* em fermentador de 2 L a partir de etanol e de glicose. Observou-se que a glicose é mais favorável para a produção de pigmentos que o etanol. O que indica que a glicose é o melhor substrato para maior produção de pigmentos vermelhos por *Monascus*.

Outros autores (SILVEIRA et al., 2008) estudaram a produção de pigmentos por *Monascus purpureus* em cultivo submerso utilizando bagaço de uva de indústrias de vinhos como substrato. A condição ótima de produção resultou em 9 UA de pigmentos vermelhos. Os resultados encontrados concordam, então, com os resultados da literatura para cultivos com glicose e outros resíduos.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), pigmentos vermelhos (UA) e a produtividade máxima de pigmentos (PM) para os cinco cultivos. A formação de pigmentos vermelhos foi maior no cultivo A, sendo seguida dos cultivos C e D e com menor produção de pigmentos no cultivo E.

A maior velocidade específica de crescimento foi observada no cultivo E (composto de glicerol), indicando que houve crescimento, porém, a produção de pigmentos não foi favorecida. Para Hajjaj et al. (2000), a máxima velocidade específica de crescimento observada utilizando glicose foi de 0,035h⁻¹.

Já as produtividades médias de pigmentos vermelhos, laranja e amarelos foram maiores no cultivo A, que continha apenas glicose como substrato. O mesmo foi observado em estudos anteriores utilizando apenas o glicerol sintético como substrato (MEINICKE, 2008).

3 CONCLUSÃO

Observando os resultados conclui-se que é possível a produção de pigmentos vermelhos *Monascus* utilizando como substratos os resíduos glicerina bruta e glicerina destilada. A glicerina destilada favoreceu o crescimento e a produção de pigmentos provavelmente devido a menor quantidade de substâncias residuais presentes.

A glicose ainda é o melhor substrato, que apresenta maior produtividade, porém a utilização da glicerina bruta pode ser economicamente viável. Assim, pode se obter produtos de maior valor agregado, como os pigmentos *Monascus*, utilizando os co-produtos do biodiesel, como a glicerina bruta, sem nenhum tratamento prévio.

REFERÊNCIAS

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, Y. Jackfruit Seed – a novel substrate for the production of monascus pigments through solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, n. 4, p. 465–471, 2006.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*, n. 44, p. 313-321, 2006.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Biology and Technology*, n. 100, p. 356-361, 2009.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; KOTA, K.; BANDI, R. Glycerol based automotive fuels from future biorefineries. *Fuel*, n. 86, p. 806 – 2809, 2007.

HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GOMA, G.; FRANÇOIS, F. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *Fems Microbiology Letters*, n. 164, p. 195-200, 1998.

HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 8, p. 619-625, 2000.

HAMANO, P. S.; OROZCO, S.; KILIKIAN, B. V. Concentration determination of extracellular and intracellular red pigments produced by *Monascus* ssp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, n. 48, p. 43-49, 2005.

HAMDI, M.; BLANC, P. J.; LORET, M. O.; GOMA, G. A new process for red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus*. *Bioprocess Engineering*, n. 17 p. 75-79, 1997.

JUZLOVÁ, P.; MARTÍNKOVÁ, L.; KREN, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, n. 16, p. 163-170, 1996.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSSSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 231-238, 2005.

MEINICKE, R. M. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. *Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MEINICKE, R. M.; MÜLLER, B. L.; MORITZ, D. E.; NINOW, J. L. Evaluation of the production of *Monascus* pigments using biodiesel co-products as substrates. *Anais do IV Congresso Internacional de Bioprocessos na Indústria de Alimentos - Curitiba/PR*, 2010.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*, p. 191-208, 2000.

PASTRANA, L.; BLANC, P. J.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O.; GOMA, G. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Process Biochemistry*, n. 30, p. 333-341, 1995.

SILVEIRA, S. T.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT*, n. 41, p. 170-174, 2008.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, 1996.