

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS POR *Monascus ruber* CCT 3802 UTILIZANDO CANA DE AÇÚCAR COMO SUBSTRATO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

D. ISFRAN¹; J. ALTHOFF²; D.E. MORITZ³ E F. VENDRÚSCULO⁴

^{1, 2, 3} Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

⁴ Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Engenharia de Alimentos.

E-mail para contato: deemoritz@gmail.com

RESUMO – o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* (CCT 3802) em meio de cultivo submerso contendo caldo de cana diluído (aproximadamente 3°Brix) e bagaço de cana (10 g.L⁻¹) desidratado por liofilização como fontes de carbono. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo 250 mL de volume de meio, a 30 °C de temperatura, pH inicial 5,5, 150 rpm de frequência de agitação. A fonte de nitrogênio foi a glicina, responsável pela formação de complexos vermelhos hidrossolúveis. Os resultados demonstraram que esta linhagem de fungo produz concentrações elevadas de pigmento vermelho (21,8 U_{Abs509}), sugerindo que o fungo *Monascus* utiliza além da glicose como substrato, outros carboidratos oriundos da hidrólise da celulose. Além disso, há poucos relatos bibliográficos sobre a fermentação submersa em caldo-de-cana o que justifica este tipo de estudo.

Palavra chave: biopigmento, *Monascus ruber*, cana de açúcar.

1. INTRODUÇÃO

O estudo e uso de pigmentos naturais nas indústrias de alimentos têm aumentado nos últimos anos devido à toxicidade apresentada pelos de origem artificial. *Monascus ruber* é um fungo filamentosos conhecido por produzir pigmento vermelho, laranja e amarelo, em diferentes condições de cultivo. Paralelo ao crescimento do mercado de alimentos naturais cresce a preocupação com o aproveitamento de resíduos agroindustriais, constituídos principalmente de carboidratos polimerizados, dos quais a celulose é o mais abundante, compreendendo cerca de dois terços de toda a matéria orgânica existente no planeta (Santos *et al.*, 2012).

Materiais lignocelulósicos na forma de biomassa de plantas, como o bagaço de cana de açúcar, são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono e são constituídos, principalmente, de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (Badhan *et al.*, 2007). Normalmente, diversos tratamentos físico-químicos são realizados para utilização do caldo da cana como meio de cultivo, tais como a filtração, clarificação, precipitação, hidrólise química ou enzimática, etc.; o que muitas vezes, elevam os custos de produção ou aumentam o tempo para obtenção do produto final desejado.

Monascus ruber van Thiehen é um fungo encontrado na natureza que se desenvolve em amido e está presente em muitos alimentos. Esta espécie metaboliza celulose, maltose, frutose e glicose, ocorrendo produção de pigmentos conhecidos como pigmentos *Monascus*, como mostrado na (Figura 1) (Jung *et al.*, 2003).

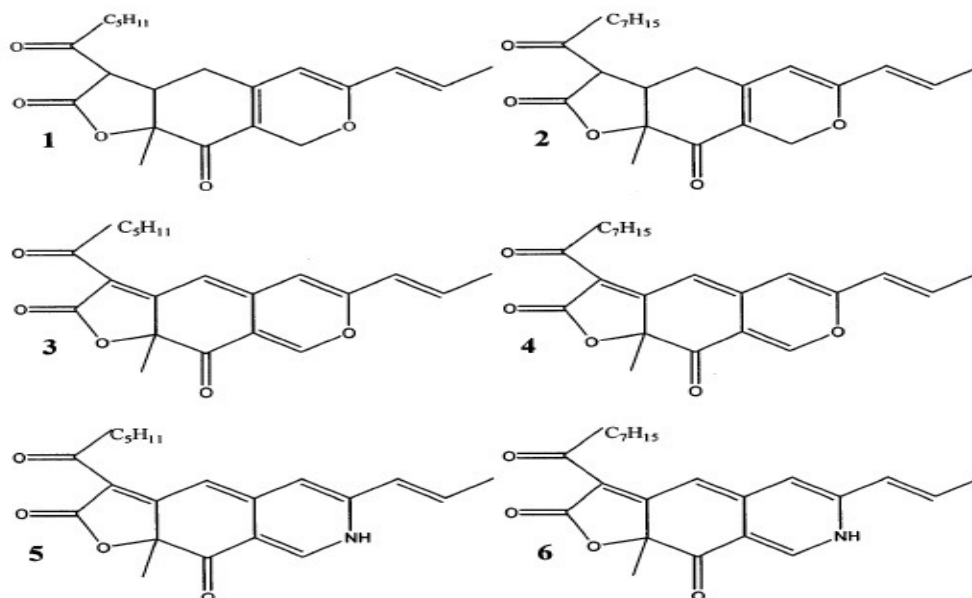


Figura 1 – Estrutura dos seis principais pigmentos produzidos por *Monascus*: 1, monascin; 2, ankaflavin; 3, monascorubrin; 4, rubropunctatin; 5, monascorubramine; 6, rubropunctamine.

Fonte: Jung *et al.* (2003).

Os fungos filamentosos produzem uma ampla diversidade de metabólitos secundários e são explorados em muitos processos industriais, como produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos naturais e lipídeos. Muitas dessas substâncias são produzidas comercialmente e outras apresentam valor potencial para a biotecnologia (Bühler, 2013).

O gênero *Monascus* é dividido em sete espécies denominadas *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. floridans*, *M. pallens*, *M. sanguineus* e *M. mucoroides*. Porém, as espécies de maior importância para a indústria alimentícia são: *M. ruber*, *M. purpureus* e *M. pilosus* (Blanc, 1998).

Monascus spp utilizam preferencialmente carboidratos como fonte de carbono e energia e produzem compostos como etanol, enzimas e metabólitos secundários pela via policetílica (Hajjaj *et al.*, 1998). Vários metabólitos já foram caracterizados quimicamente tais como pigmentos (Hajjaj *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2012), ácido γ -aminobutírico (GABA) e ácido dimerúmico (Juzlova, Martinkova; Kren, 1996), α -amilase e glucoamilase (Yoshizaki *et al.*, 2010) e a micotoxina citrinina (Blanc; Loret; Goma, 1995; Jia *et al.*, 2010). Estes metabólitos possuem várias funções, incluindo, antioxidante (Yang *et al.*, 2006), anti-hiperlipidêmica (Choe *et al.*, 2012), anti-inflamatória (Cheng *et al.*, 2012), anticarcinogênica (Akihisa *et al.*, 2005) e com atividade antibacteriana (KIM *et al.*, 2006) e anti-fúngica (Cheng *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, os países asiáticos produzem o pigmento em meio sólido através da fermentação do arroz como substrato e poucos trabalhos em cultivo submerso são relatados na bibliografia (Moritz, 2005). Comumente, o pigmento vermelho é o que apresenta maior valor comercial, utilizado como corante alimentar (Yoshizaki *et al.*, 2010). No Brasil, a utilização do pigmento *Monascus* como aditivo natural ainda não está prevista na legislação (ANVISA, 2014), embora o *Red Yeast Rice* de origem asiática seja comercializado para todo o mundo.

Baseado neste contexto, o foco deste trabalho foi estudar a produção de biopigmentos vermelhos formados por cultivo submerso a partir do fungo filamentosso *Monascus ruber* CCT3802 em cana de açúcar como principal fonte de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado nos cultivos foi o fungo filamentosso *Monascus ruber* CCT3802 (correspondente à cepa ATCC nº. 36928), adquirido do Centro de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas André Tosello (Campinas-SP). O microrganismo foi mantido em meio de caldo de cana, composto por cana de açúcar (3 ° BRIX), glicina (5,0 g.L⁻¹) e ágar bacteriológico (15 g.L⁻¹). A manutenção da linhagem foi realizada em tubos de ensaio contendo ágar inclinado a 30°C, por 7 dias e posteriormente a 4 °C. O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer aletados de 1L contendo 250 mL de volume de meio e incubado a 30 °C por 48 horas em agitador orbital (150 rpm). O pH inicial foi ajustado em 5,5 com ácido fosfórico 85%.

2.2. Meio de cultivo CBC (Caldo e Bagaço de Cana)

O meio de cultivo empregado nos experimentos foi composto por cana de açúcar (3 ° BRIX), glicina (5,0 g.L⁻¹) e bagaço de cana desidratado (1 g.L⁻¹) preparados em frascos Erlenmeyer aletados de 1L contendo 250 mL de volume de meio e incubado a 30 °C por 120 horas em agitador orbital (150 rpm). O pH inicial foi ajustado em 5,5 com ácido fosfórico 85%.

2.3. Meio de cultivo AM (Amido de Arroz)

O meio de cultivo utilizado como controle foi baseado nos estudos de MORITZ (2005) cujos constituintes foram glicose (2 g.L^{-1}), glicina (5 g.L^{-1}) e amido de arroz (20 g.L^{-1}), preparados em frascos Erlenmeyer aletados de 1L contendo 250 mL de volume de meio e incubado a 30°C por 120 horas em agitador orbital (150 rpm). O pH inicial também foi ajustado em 5,5 com ácido fosfórico 85%.

2.4. Determinação da concentração de carboidratos

O teste empregado para a determinação de glicose foi o da *Biodiagnóstica - Enz color*, que utiliza o método da glicose-oxidase e para a determinação dos açúcares redutores (AR) foi utilizado o método de ácido dinitrossalicílico (DNS) segundo (Somogy, 1952) em 540 nm.

2.5. Determinação de proteínas totais

O teste empregado para a determinação de proteínas foi o de Bradford (1976) – Proteínas Totais. Este método é baseado na interação entre o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

2.6. Preparo da amostra e determinação de Pigmento

Após 120 horas de incubação, 200 mL do fermentado de arroz (AM) e do fermentado de cana de açúcar (CBC) foram liofilizados em liofilizador (LIOBRAS, modelo L101, Brasil) e armazenados em freezer (BOSH) à temperatura de -24°C . Para a análise de pigmento em espectrofotômetro foram preparadas soluções aquosas (1 g.L^{-1}) e alcoólicas ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) de cada um dos fermentados e os espectros de absorção dos pigmentos foram analisados por varredura por espectrofotometria UV/Vis (HITASHI U-2900, Japão) utilizando uma cela de 1 cm. A concentração de pigmentos é expressa em Unidades de Absorbância ($U_{\text{abs.}\lambda}$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados dos principais parâmetros cinéticos do processo fermentativo conduzido em caldo e bagaço de cana como principal fonte de carbono e a produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso em frascos agitados (Erlenmeyer), mantidos a 30°C por 120 horas em agitador orbital (150 rpm).

Tabela 1 – Resultados da cinética de *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando cana de açúcar como substrato em fermentação submersa.

Tempo (h)	Carboidratos		Proteínas Totais mg.L	pH
	Conc. AR g.L	Conc. Gli g.L		
0	52,02	31,54	23,18	5,5
24	41,40	35,84	118,34	5,6
48	32,72	29,83	61,38	7,1
72	28,43	25,89	54,78	7,2
96	17,25	13,03	83,36	7,3
120	9,53	7,05	37,87	6,9

*AR = Açúcar Redutor; (g.L

A biomassa final foi de 11,34 g.L⁻¹ e o Y_{X/S} - coeficiente de rendimento em biomassa (g biomassa/g de açúcar consumido) foi de 0,22 g.g⁻¹. Resultados similares quanto a biomassa e coeficiente de rendimento em biomassa foram relatados por Moritz (2005) utilizando amido de arroz e Pisareva e Kujumdzieva (2010) utilizando glicose como principal fonte de carbono.

O pH do caldo fermentativo gerado pelo fungo *Monascus ruber* no meio CBC variou entre 5,5 (inicial) e 6,9 (final). Para o meio de cultivo utilizando amido de arroz (AM) como substrato e mesmo pH inicial foi encontrado um pH final de 8,2. Esta diferença de valores finais de pH sugerem que mais metabólicos ácidos são formados pela degradação do bagaço e da cana de açúcar, diferentemente da degradação do amido do arroz.

Os pigmentos oriundos do processo fermentativo foram qualificados por espectroscopia de varredura entre os comprimentos de onda: 200 nm e 700 nm. O resultado da análise espectral (Figura 2) do pigmento dissolvido em água na concentração de 1 g.L⁻¹ e em etanol na concentração de 0,1 g.L⁻¹ obedeceram a Lei de Beer, como expresso pela Equação 1.

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

Onde A = absorvância; ϵ = coeficiente de absortividade molar do meio (L.mol⁻¹.cm⁻¹); b = espessura do volume de observação (1cm) e c = concentração de átomos no estado fundamental.

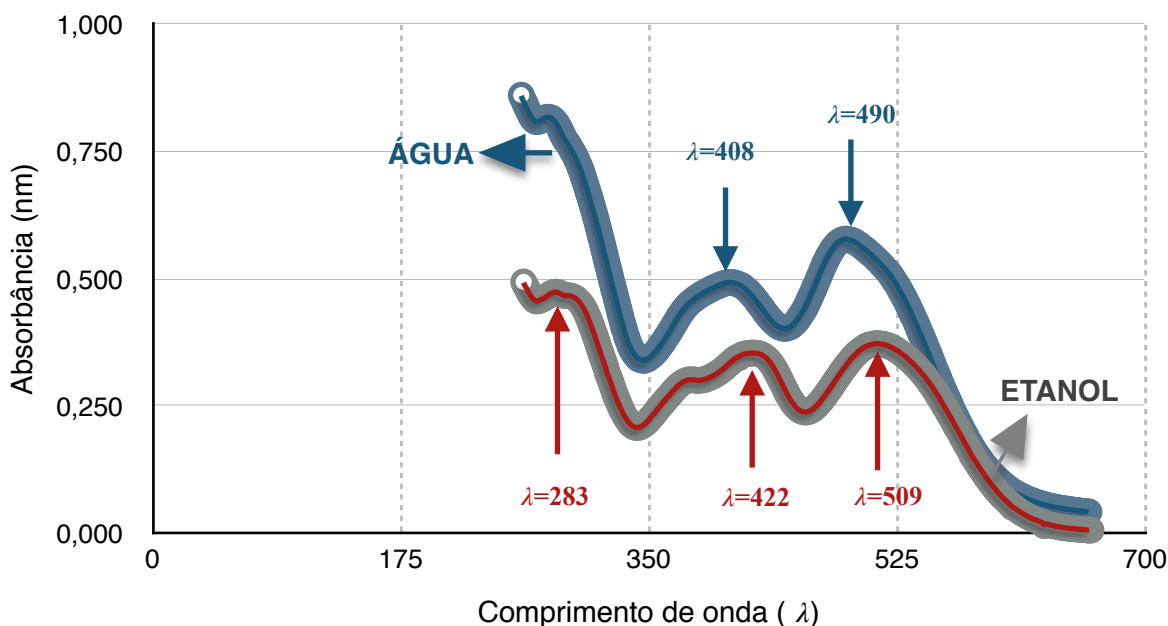


Figura 2 – Espectro de varredura em espectrofotômetro entre os comprimentos de onda: 200 nm - 700 nm de pigmento *Monascus* dissolvido em água na concentração de 1 g.L⁻¹ e dissolvido etanol na concentração de 0,1 g.L⁻¹. O fator de diluição (FD) utilizado foi FD 3 para água e FD 4 para etanol. Os comprimentos de onda máximos (λ_{max}) estão apresentadas no gráfico ($\lambda=283$ nm; $\lambda=422$ nm e $\lambda=509$ nm para etanol (em vermelho) e $\lambda=408$ nm e $\lambda=490$ nm (em azul) para água como solvente).

É possível observar através deste gráfico espectral que há distinção entre as faixas de cor absorvidas quando se modifica o solvente utilizado. Quando o pigmento *Monascus* foi dissolvido em etanol verifica-se duas faixas espectrais na região Visível (*Vis*) $\lambda=422$ nm e $\lambda=509$ nm e, que correspondem à transmissão da cor amarelo e púrpura, respectivamente. A outra na faixa espectral corresponde a região Ultra-Violeta *UV* ($\lambda=283$ nm). Já para a água como solvente, apenas duas outras faixas *Vis* foram observadas $\lambda=408$ nm e $\lambda=490$ nm, que, segundo Skoog *et al.* (2007) correspondem respectivamente, à faixa de cor transmitida verde-amarelo ($\lambda=400-435$ nm) e vermelho ($\lambda=490-500$ nm). Apesar de solventes distintos, a faixa de cor transmitida como verde-amarelo foram detectadas tanto na água quanto no etanol.

Segundo Skoog *et al.* (2007) as absorvâncias são funções dependentes de variáveis como o tipo de solvente, a composição da solução e da temperatura. Por causa da variação da absorvância com esses parâmetros, nunca é muito prudente tornar-se dependente de valores tabelados na literatura para realizar uma análise quantitativa. Portanto, uma solução padrão do analito no mesmo solvente e à mesma temperatura é empregada para se obter a absorvância no momento da análise. Em se tratando do Pigmento *Monascus*, cujo padrão é inexistente

comercialmente, por apresentar mais de um cromóforo e ainda, os espectros de absorção desses cromóforos se sobrepõem numa dada extensão de comprimento de onda, não é possível afirmar que a região de absorbância máxima (λ) 410 nm corresponde ao pigmento *Monascus* amarelo, que o comprimento de onda (λ) 420 nm corresponde ao pigmento laranja ou o comprimento de onda (λ) 510 corresponde ao pigmento vermelho como afirmado por alguns autores (Juzlova, Martinkova; Kren, 1996, Hajjaj *et al.*, 1998).

Os pigmentos oriundos do processo fermentativo foram quantificados baseado na avaliação espectral descrita anteriormente. As concentrações máximas encontradas nos comprimentos de onda (λ) 509 nm e (λ) 420 nm foi de 21,77 U_{Abs509} e 7,21 U_{Abs420} (pigmento púrpura e amarelo, respectivamente, dissolvidos em etanol). Já para os pigmentos dissolvidos em água, as concentrações máximas encontradas nos comprimentos de onda (λ) 490 nm e 408 nm foram de 15,40 U_{Abs490} e 5,56 U_{Abs408} (pigmento vermelho e pigmento amarelo, respectivamente).

Segundo Vendruscolo (2009) os pigmentos gerados pelo fungo *Monascus ruber* apresentam comportamentos diferentes, principalmente em função do tipo de substrato utilizado. O pigmento vermelho é solúvel em água e, conseqüentemente, solúvel no meio de cultivo, composto por níveis superiores a 95% de água. Devido à afinidade por grupos amino, os pigmentos de *Monascus* estão associados freqüentemente a proteínas ou à parede celular, formando um complexo que pode ser de difícil extração na fase aquosa e facilitada na fase alcoólica, o que pode justificar a diferença espectral observada na Figura 2.

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho são importantes, tanto para o emprego do cultivo submerso, como para fornecer dados bastante úteis para novos estudos utilizando cana de açúcar para a produção de pigmentos vermelhos.

A concentração elevada de proteínas totais aliada ao consumo de substrato indica uma hipótese de produção de enzimas importantes, principalmente as celulolíticas que possuem grande interesse comercial na atualidade e que merecem ser mais bem investigados.

5. REFERÊNCIAS

- BADHAN, A. K.; Chadha, B. S.; Kaur, J.; Saini, H. S.; Bhat, M. K. (2007). Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099.; *Bioresour. Technol.*, 98p, 504-510. 2007.
- BLANC, P. J.. Les Pigments Rouges de *Monascus*. *Biofutur*, v. 184, p. 13-17. 1998.
- BLANC, P. J.; LORET, M. O.; GOMA, G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotech. Lett.*, v. vol. 17, n. 3, p. 291-294. 1995

- BÜHLER, R. M. M. Produção de Pigmentos por *Monascus ruber* utilizando Co-produtos da produção de Biodiesel. 182 (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, SC. 2013.
- CHENG, M.-J. *et al.* Chemical constituents from the fungus *Monascus purpureus* and their antifungal activity. *Phytoch. Lett.*, v. 4, n. 3, p. 372-376. 2011.
- CHENG, M.-J. *et al.* Antiinflammatory compounds from *Monascus pilosus*-fermented rice. *Phytoch. Letters*, v. 5, n. 1, p. 63-67. 2012.
- CHOE, D. *et al.* Evaluation of the amine derivatives of *Monascus* pigment with anti-obesity activities. *F. Chemistry*, v. 134, n. 1, p. 315-323. 2012.
- HAJJAJ, H. *et al.* Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *Fems Microb. Letters*, v. 164, n. 1, p. 195-200. 1998.
- HU, Z. *et al.* Export of intracellular *Monascus* pigments by two-stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous. *J. of Biotechnol.* n. 162, p. 202-209. 2012.
- JIA, X. *et al.* Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. *Metabolic Eng.*, v. 12, n. 1, p. 1-7. 2010.
- JUNG, K.; CHULYOUNM, K.; KIM, K.; SHIN, C.S. Color Characteristics of *Monascus* Pigments Derived by Fermentation with Various Amino Acids. *J. of Agricultural and Food Chem.*. V. 51; p. 1302-1306. 2003.
- JUZLOVA, P. L.; MARTINKOVA, L.; KREN, V. (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*. *J. Industrial Microbiol.*, v. 16, p. 163-170.
- KIHISA, T. *et al.* (2005). Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus* - fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J. of Agricultural and Food Chem.*, v. 53, p. 562-565.
- KIM, C. *et al.* (2006). Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *monascus* pigments. *FEMS Microbiol. Lett. App. Microbiol.*, v. 264, p. 117-124.
- MORITZ, D. E. Produção de pigmento *monascus* por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso. Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Doutorado: 134 p. 2005.
- PISERAVA, E.I.; KUJUMDZIEVA, A.V. Influence Of Carbon And Nitrogen Sources On Growth And Pigment Production By *Monascus pilosus* Strain. *Biotechnol. & Biotechnol.* p. 501-506. 2010.

- SANTOS, F.A., QUEIRÓZ, J.H., COLODETTE, J.L., FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da Palha de Cana-de-açúcar Para Produção de Etanol. *Quím. Nova.* vol. 35, nº5, p. 1004-1010. 2012.
- SKOOG, D.A; *et al.* *Fundamentos da Química Analítica*, Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed.Thomson, 2007.
- VENDRÚSCULO, F. Produção de Pigmento Vermelho a partir do Pigmento Laranja Produzido por *Monascus ruber* CCT 3802. Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis: UFSC. Doutorado: 241 p. 2009.
- WANG, S. L.; HSIAO, W. J.; CHANG, W. T. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *J. of Agr. and Food Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 2249-2255, Apr 10 2002.
- YANG, J.-H. *et al.* Antioxidant properties of methanolic extracts from monascal rice. *Food Science and Technology*, v. 39, n. 7, p. 740-747,, 2006.
- YOSHIZAKI, Y. *et al.* Characterization of glucoamylase and α -amilase from *Monascus anka*: Enhanced production of α -amylase in red koji. *J. of Bioscience and Bioeng.* v. 110, n. 6, p. 670-674, 2010.