

Produção de pigmentos alimentares por *Monascus ruber* CCT 3802 sob diferentes condições de pH

Valéria Cristina Oliveira¹, Franciello Vendruscolo²

Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. CEP: 74690-900, Goiânia, GO. Telefone (62) 3521-1615;
Fax: (62) 3521-1600. E-mail: valeriatina@hotmail.com e franciello@hotmail.com.

Palavras-chave: *Monascus ruber*, pH, pigmentos, velocidade de crescimento radial.

1. INTRODUÇÃO

Há milénios que o homem conhece diversas espécies de fungos e as utiliza para os mais diversos fins. Uma das mais importantes aplicações dos fungos são o seu uso na forma gastronómica, quer como alimento, quer para transformação/produção de alimentos (SILVA, 2007).

Para a indústria alimentícia, a cor é extremamente importante e fator determinante na palatabilidade e aparência dos alimentos. Pigmentos sintéticos, tradicionalmente usados nos processamentos alimentícios, continuam sendo utilizados com sucesso, mas, por outro lado, está ocorrendo o aumento da preferência do consumidor por aditivos alimentares naturais. Apesar da ótima oportunidade na utilização de pigmentos de origem biotecnológica, como o β -caroteno e a riboflavina, seu segmento é limitado. Isto se deve ao elevado custo de produção destes pigmentos extraídos de fontes naturais em relação aos pigmentos sintéticos (GUNNARD et al., 1994).

Muito se fala na utilização de produtos naturais. A produção de pigmentos por microrganismos que possuem capacidade de produção de corantes orgânicos, dentre eles, algas, microalgas, leveduras e fungos filamentosos (DUFOSSÉ et al., 2005).

Os fungos filamentosos, potenciais produtores de pigmentos naturais, são organismos promissores para a indústria produtora de proteínas heterólogas, ácidos orgânicos e policetídeos. Policetídeos são produtos naturais estruturalmente complexos e extremamente ricos em moléculas bioativas. Incluem um número grande de importantes produtos

Revisado pelo Orientador.

¹ Aluna do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás (Bolsista PIVIC).

² Professor do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás (Orientador).

farmacêuticos, antibióticos, agentes anticancerígenos, imunossupressores, agentes antiparasitários, antifúngicos, agentes cardiovasculares; produtos veterinários e aditivos alimentares, especialmente pigmentos (KUJUMDZIEVA, HALLET, SAVOV et al., 1997).

Espécies de *Monascus* podem produzir pigmento amarelo, laranja e vermelho. A utilização deste fungo é muito difundida no Japão, China, Indonésia, Índia e Coréia. Estes corantes são utilizados nestes países na coloração de arroz, peixes, vinhos, bebidas (Hajjaj et al., 2000a) e, ainda, uma promissora utilização na coloração de produtos cárneos em substituição aos sais de nitrito que conferem coloração vermelha e, ao mesmo tempo, a produção de nitrosaminas, compostos que possuem efeitos cancerígenos (FINK-GREMMELS et al., 1991; KILIKIAN et al., 2003; MORITZ, 2005).

Diante deste cenário, o fungo *Monascus* se destaca, uma vez que existe mais de cinquenta patentes sobre a produção de pigmentos vermelhos, laranja e amarelo, por este microrganismo, principalmente no Japão, EUA, França e Alemanha. O consumo anual de pigmentos, obtidos a partir de espécies do fungo *Monascus*, no Japão cresceu de 100 toneladas em 1981 para 600 toneladas em 1992 e em valores de 12 milhões de dólares de acordo com relatos publicados em 1992 e 1995 (LIN, YAKUSHIJIN e DEMAIN, 1992; LEE, CHEN, CHAUVATCHARINS et al., 1995; HAJJAJ, KLAEBE, LORET et al., 1997).

A utilização dos pigmentos produzidos pelo *Monascus* sp. não é liberada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, embora a produção de um composto semelhante ao pigmento monascus possa abrir novos horizontes para a legalização do pigmento, haja vista que a principal justificativa não só da legislação brasileira, como da comunidade européia, está baseada na presença da citrinina, toxina produzida pelo *Monascus*. A produção do pigmento vermelho através do pigmento laranja pode proporcionar a redução na concentração de citrinina ou, até mesmo, a sua ausência, com possibilidades de obtenção de pigmentos altamente concentrados pela solubilização em água ou álcool etílico, substâncias legalizadas como solvente ou veículo para solubilização dos pigmentos. Com a produção do pigmento laranja, algumas etapas de *downstream* podem ser eliminadas, pois o pigmento pode ser lavado inúmeras vezes para remoção de compostos indesejáveis. Estas são algumas vantagens sobre a produção do pigmento vermelho através do método tradicional (VENDRUSCOLO, 2009).

Estima-se que o consumo brasileiro de pigmentos naturais seja da ordem 200 toneladas por ano, os quais movimentam cerca de oitenta milhões de reais. Este consumo pode vir a ser aumentado, considerando-se o amplo uso de carmim de cochinha e sais de nitrito e nitrato (substâncias mais tóxicas que o pigmento *Monascus*) na coloração de

alimentos cárneos, além das demais aplicações na indústria alimentícia (FINK-GREMMELS et al., 1991; KILIKIAN, 2002).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar a produção de pigmentos laranja e vermelho e determinar a velocidade de crescimento radial pelo fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo sólido sob diferentes condições de pH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi determinado o efeito do pH na velocidade de crescimento radial e na produção de pigmentos pelo *Monascus ruber* CCT 3802.

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802, obtido da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), mantido em Agar dextrose de batata (PDA). A manutenção dos microrganismos foi realizada em tubos de ensaio contendo Agar dextrose de batata inclinado, esterilizados a 121 °C durante 15 minutos. Logo depois de resfriados, os tubos foram inoculados, onde uma alçada de microrganismo, mantidos em meio PDA, foi transferida para tubos de ensaio com Agar inclinado, incubados a 30 °C por dias (NAGEL et al., 1999).

3.2 Velocidade de Crescimento Radial

A determinação da velocidade do crescimento radial foi obtida sob diferentes condições de pH, variando entre 2 a 7, conforme metodologia proposta por Gabiatti et al. (2006), sendo que está consiste no preparo de uma suspensão de esporos, onde três alçadas do microrganismo, cultivados em tubos de ensaio com ágar inclinado, foram transferidos para tubos de ensaio contendo 0,7 mL de Agar bacteriológico 0,2% previamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos. O Agar dextrose de batata foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos, enquanto líquido e o pH foi ajustado na faixa de 2 a 7 com NaOH (10%) ou ácido tartárico (10%). O ágar foi vertido em placas de Petri de 100 mm. Depois de solidificados, com auxílio de uma ponteira estéril de micropipeta com diâmetro de 0,5 mm, os meios de cultivo foram inoculados através da imersão da ponteira na suspensão de esporos e posteriormente toque no centro de cada placa em ambiente asséptico. Logo foram traçadas três raios no fundo de cada placa de Petri (Figura 1), passando pelo ponto de inoculação e incubadas em estufa com

temperatura de 30 °C, então a cada 24 horas, foram medidos os diâmetros. Para cada cultivo nos diferentes valores de pH foram feitas 5 repetições.

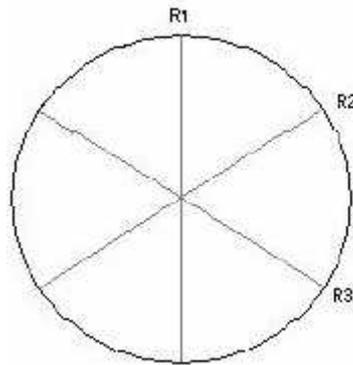


Figura 1: Raios no fundo da placa de Petri

A velocidade de crescimento radial das colônias foi obtida pela declividade da regressão linear do raio das colônias em função do tempo de cultivo, como apresentado na equação 1.

$$r(t) = V_{CR} \cdot t + b \quad (1)$$

onde: V_{CR} : velocidade de crescimento radial (mm h^{-1});

r: raio (mm);

t: tempo (h).

Sendo assim, considerou-se o raio inicial da colônia de 0,5 mm, correspondente ao raio do objeto inoculador (ponteira), resultando na equação 2.

$$r(t) = V_{CR} \cdot t + 0,5 \quad (2)$$

3.3 Determinação dos Pigmentos Produzidos

As placas contendo as colônias do *Monascus ruber*, após quantificação da V_{CR} , foram utilizadas na determinação dos pigmentos produzidos. As colônias de microrganismos foram analisadas ao aspecto visual que apresentou-se ao decorrer de seu crescimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foram obtidos os valores da influência do pH no crescimento radial dos microrganismos em ágar dextrose de batata (PDA), seguida pela diferença de cor em cada condição de cultivo.

As figuras 2 a 13 apresentam a evolução do raio das colônias do *Monascus ruber* CCT 3802 cultivados em diferentes condições de pH durante um período de 384 horas de cultivo e as imagens do crescimento das colônias com seus respectivos pigmentos produzidos.

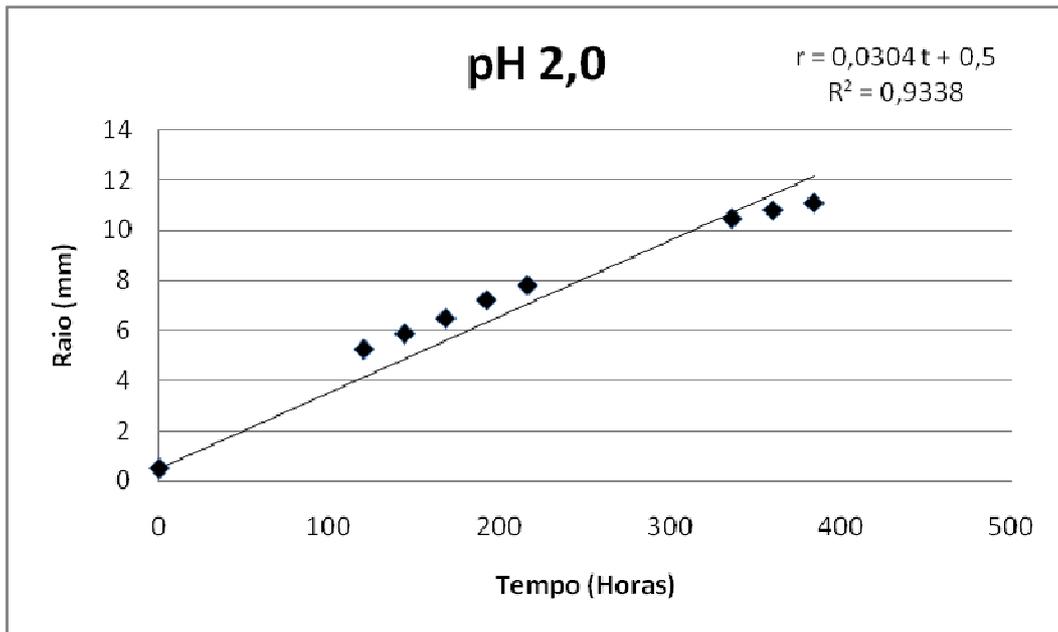


Figura 2: Velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 2,0.

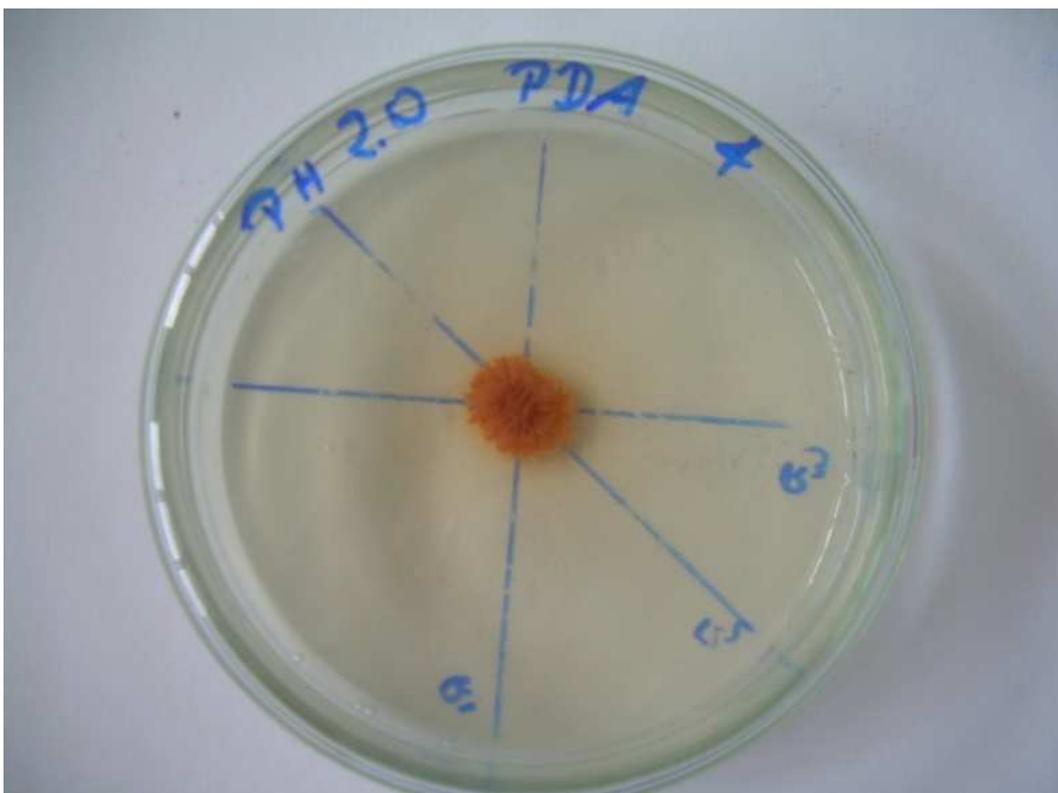


Figura 3: Cor do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 2,0.

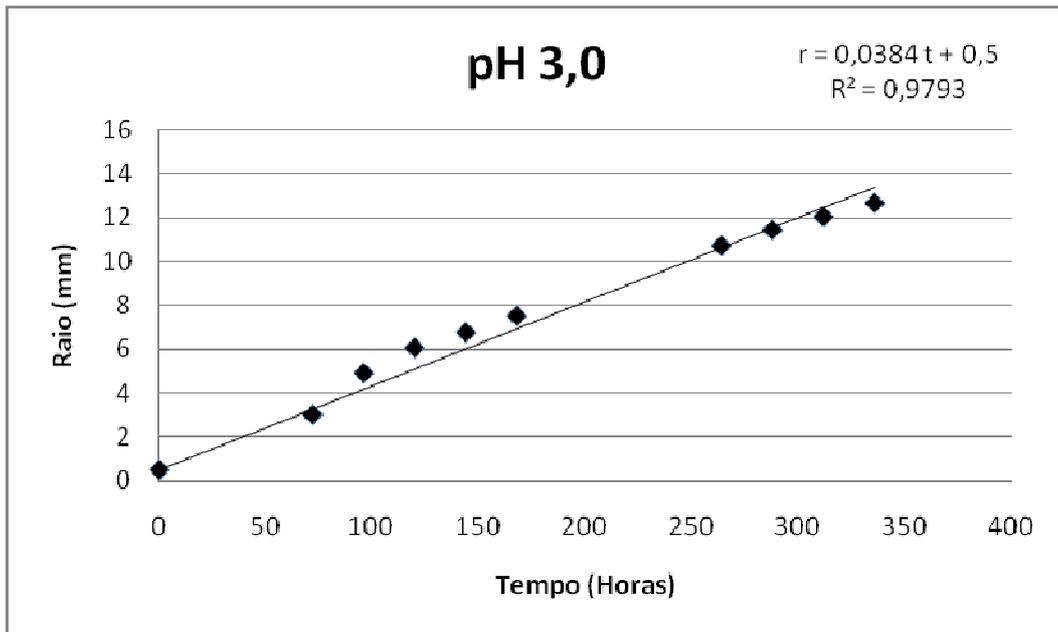


Figura 4: Velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 3,0.

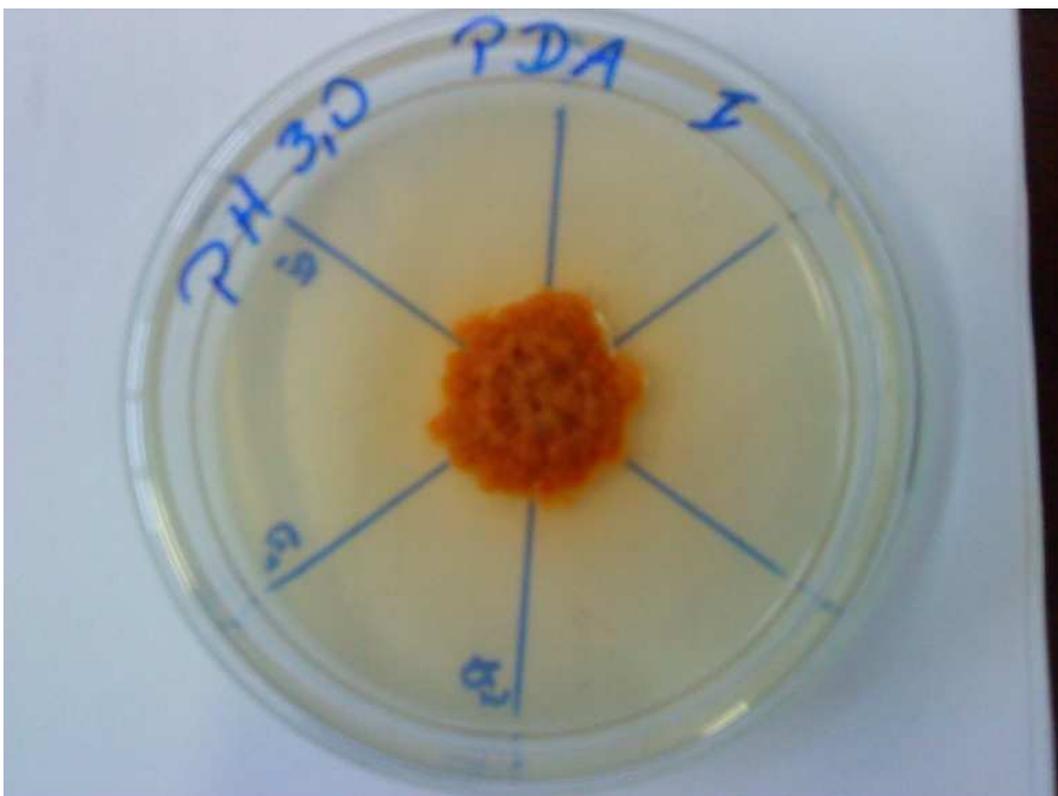


Figura 5: Cor do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 3,0.

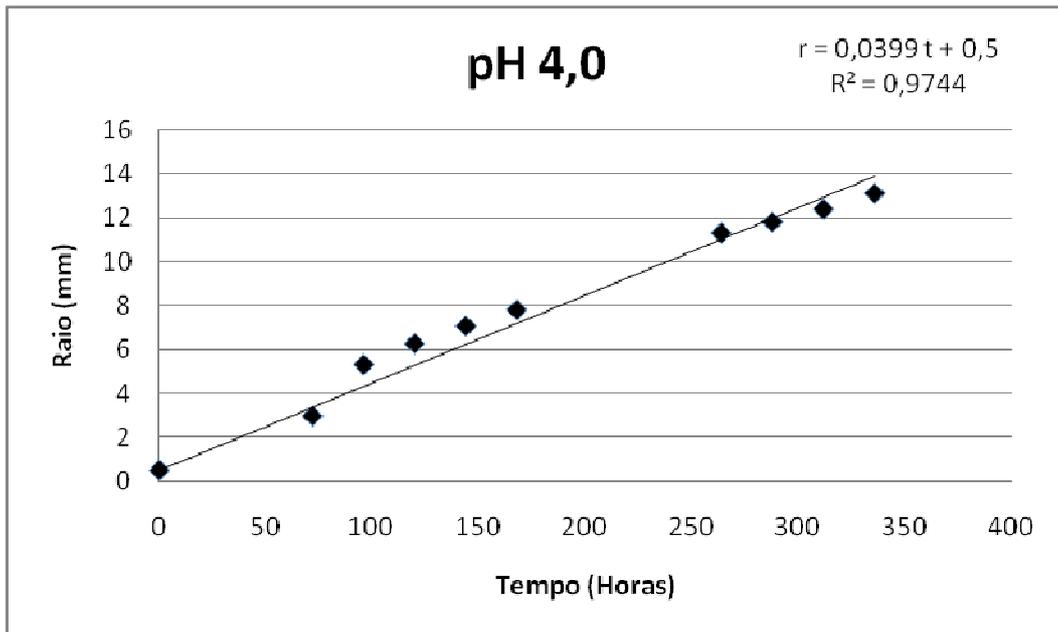


Figura 6: Velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 4,0.

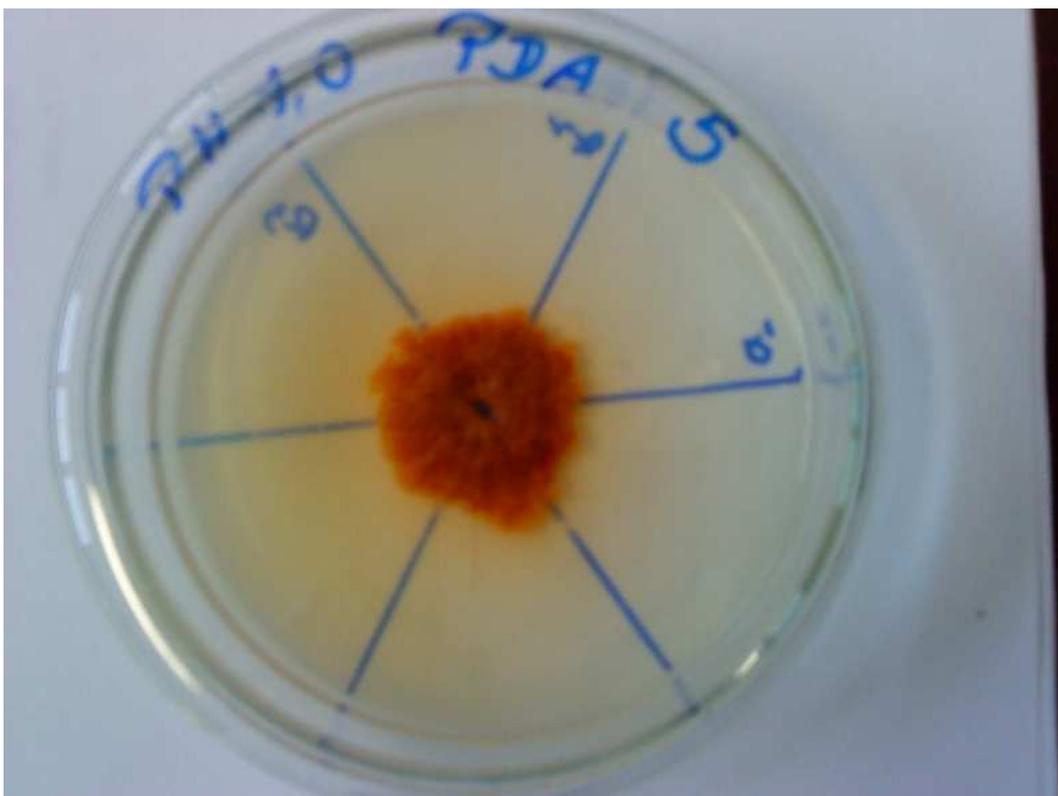


Figura 7: Cor do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 4,0.

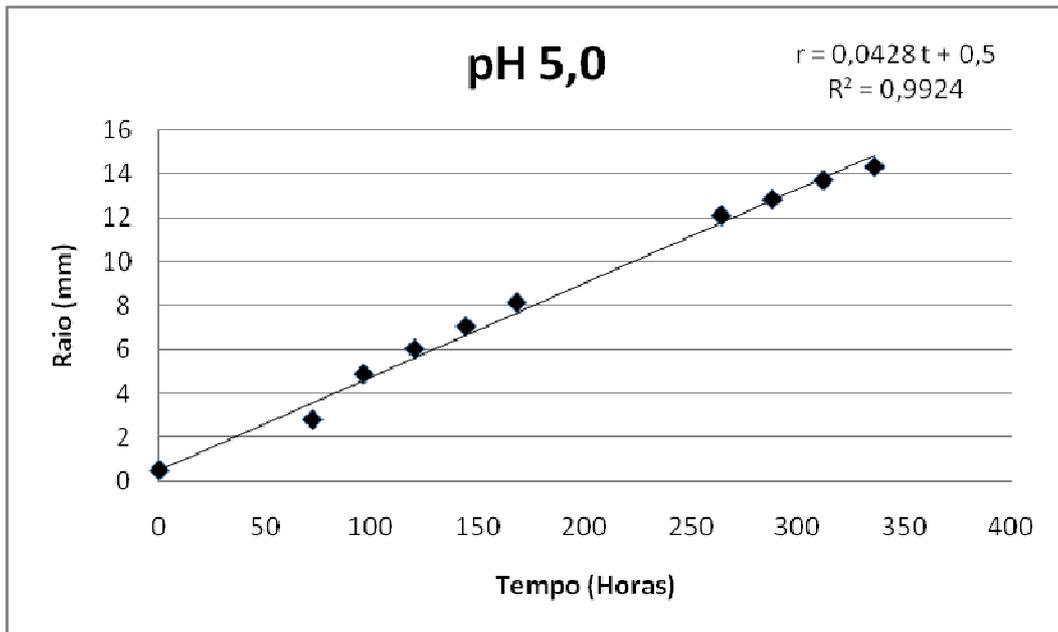


Figura 8: Velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 5,0.

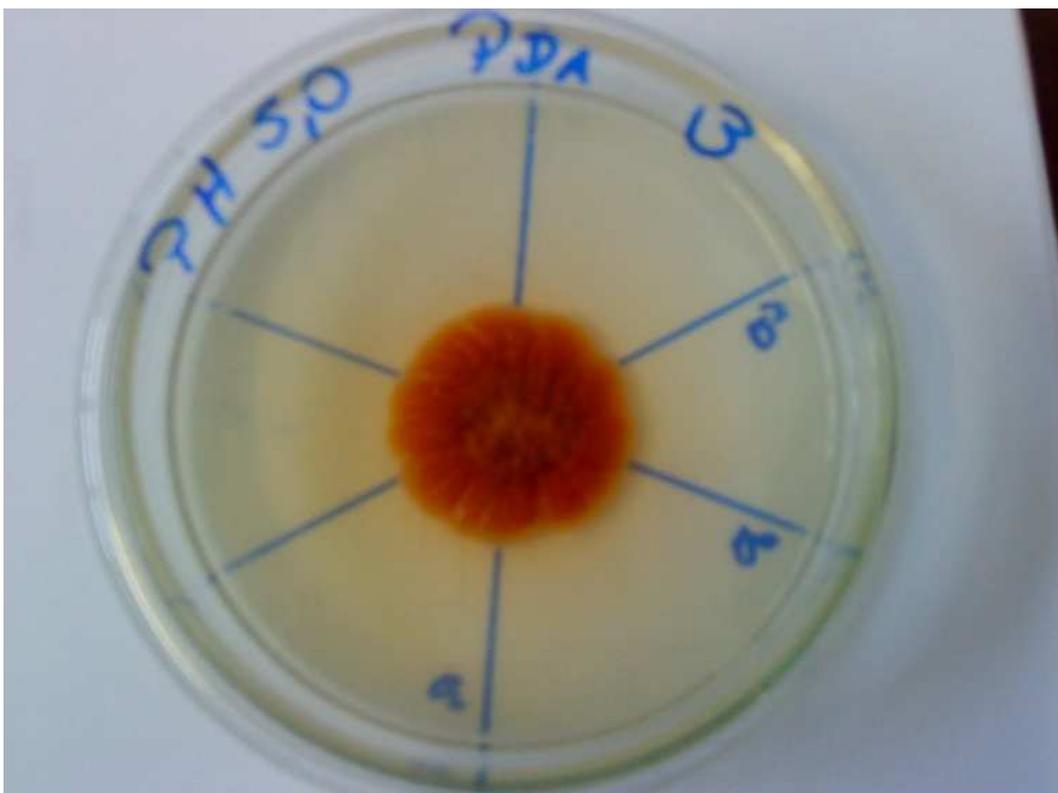


Figura 9: Cor do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 5,0.

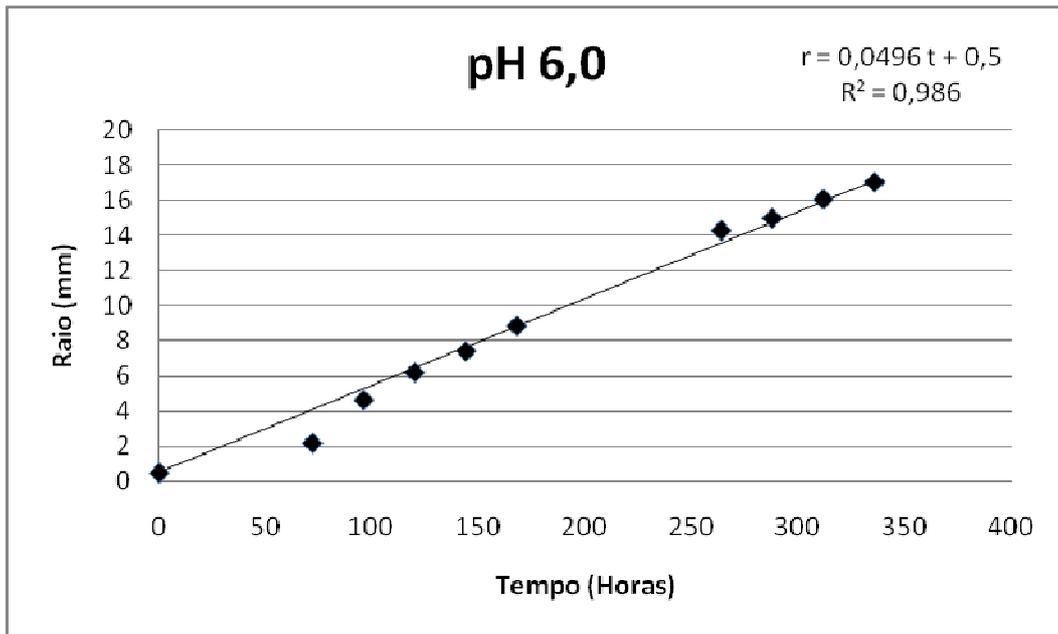


Figura 10: Velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 6,0.

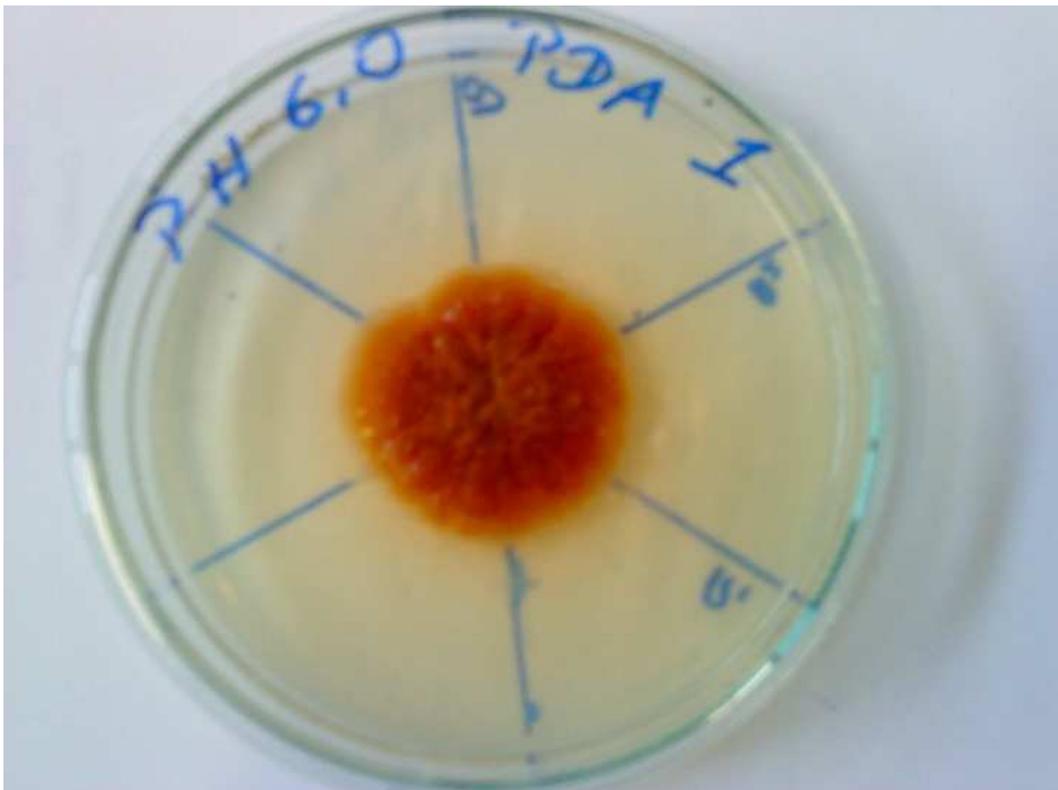


Figura 11: Cor do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 6,0.

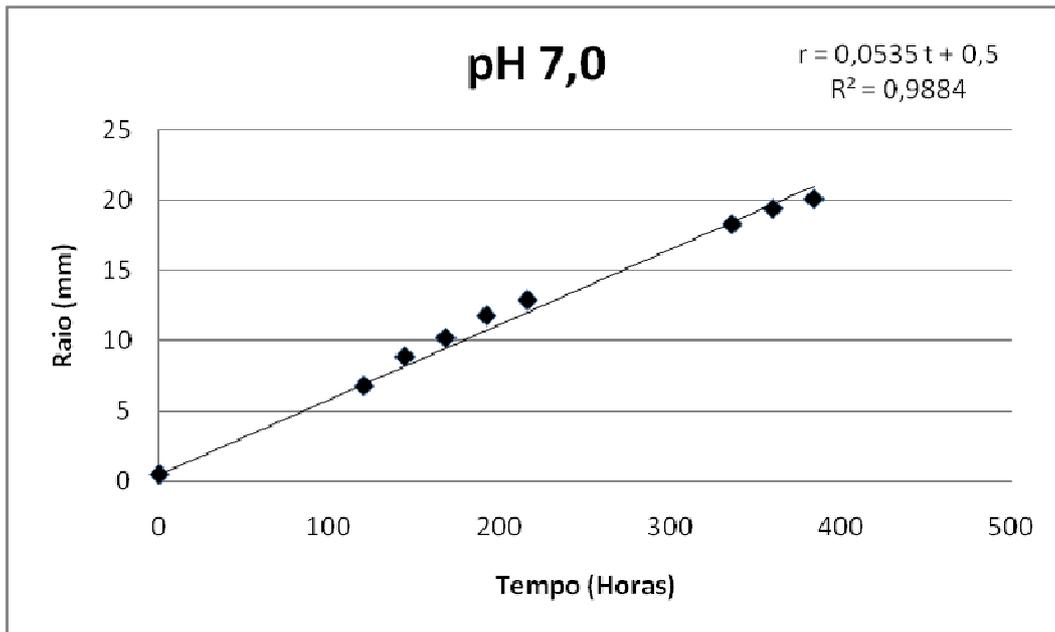


Figura 12: Velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 7,0.

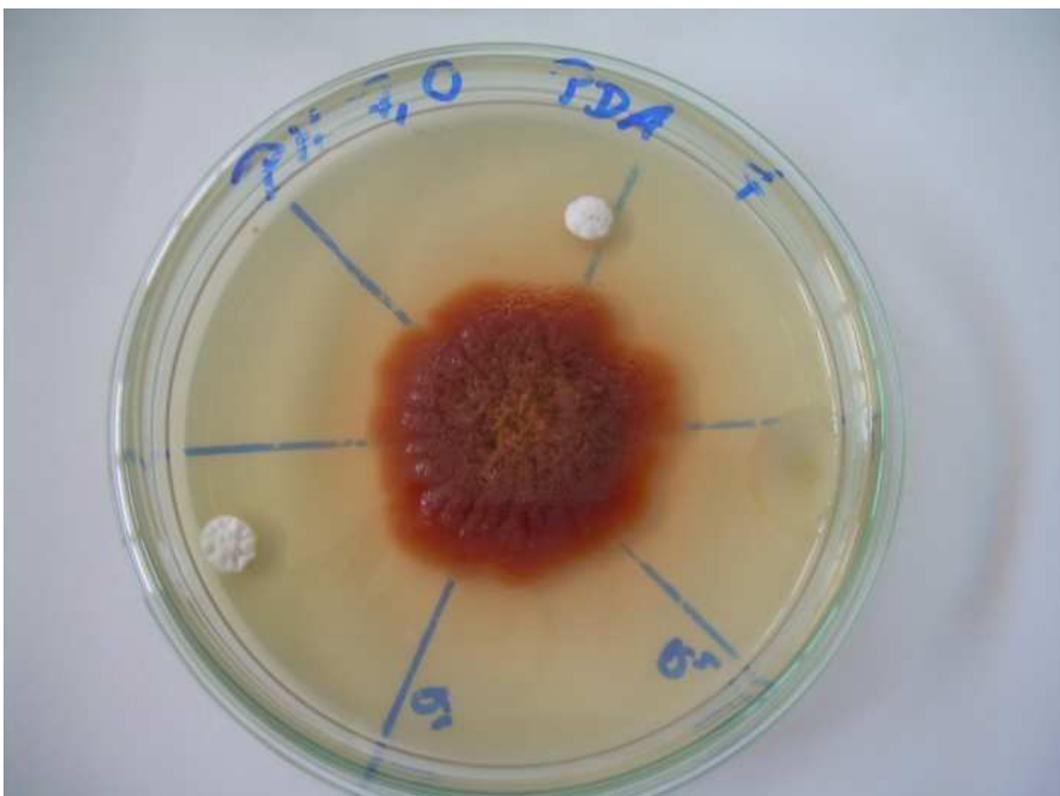


Figura 13: Cor do *Monascus ruber* cultivado a temperatura de 30 °C sob condição de pH 7,0.

Pode-se observar, através das figuras (imagens das colônias), entre a evolução do crescimento das colônias em função do tempo, é notório que os cultivos realizados entre o pH 2,0 e 3,0 favoreceu-se a pigmentação amarela, o pH 4,0 o pigmento tende do amarelo para o laranja, no pH 5,0 predomina-se o laranja, já no pH 6 houve a mudança do laranja para o

vermelho e no pH 7,0 a coloração prevalecente é a vermelha. Desta forma podemos ver que o pH tem uma influência direta no crescimento dos microrganismos *Monascus ruber*.

A Tabela 1 apresenta os resultados do raio das colônias em função do tempo de cultivo, sendo aplicada a equação 2 para determinar o crescimento radial.

Tabela 1: Velocidade do crescimento radial, equação do raio em função do tempo e aspecto visual das colônias cultivadas a 30 °C sob diferentes condições de pH.

pH	Vcr (mm h ⁻¹)	Equação	R ²	Aspecto Visual
2,0	0,0304	r = 0,0304 t + 0,5	0,9338	Amarela
3,0	0,0384	r = 0,0384 t + 0,5	0,9793	Amarelo
4,0	0,0399	r = 0,0399 t + 0,5	0,9744	Amarelo/Laranja
5,0	0,0428	r = 0,0428 t + 0,5	0,9924	Laranja
6,0	0,0496	r = 0,0496 t + 0,5	0,9860	Laranja/Vermelho
7,0	0,0535	r = 0,0535 t + 0,5	0,9884	Vermelho

A maior velocidade de crescimento radial foi obtida no cultivo realizado em pH 7,0 (0,0535 mm h⁻¹) enquanto a menor velocidade obteve-se em pH 2,0 (0,0304 mm h⁻¹). Apesar das regressões não apresentarem uma boa linearidade do raio da colônia em função do tempo de cultivo (R² > 0,99), os resultados obtidos das velocidades de crescimento radial possuíam comportamento linear em função do tempo de cultivo, igualmente, apresentados em trabalhos como de Gabiatti et al. (2006) que utilizaram a velocidade de crescimento radial para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes enquanto Lopez-Malo et al. (1995) estudaram a composição do meio de cultivo sobre a velocidade de crescimento radial no crescimento de fungos filamentosos.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o pH tem uma influência direta nos resultados da velocidade de crescimento radial quanto na coloração do microrganismos *Monascus ruber*. Maiores velocidades de crescimento radial foram obtidas quando o *Monascus ruber* CCT 3802 foi cultivado em pH 7,0.

5. REFERÊNCIAS

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a

- scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**. v.16, n.9, p.389-406. 2005.
- FINK-GREMMELS, J., J. DRESEL e L. LEISTNER. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. **Fleischwirtsch**, v.71:1184-1186, p.1184-1186. 1991.
- GABIATTI JR., C.; VENDRUSCOLO, F.; PIAIA, J. C. Z.; RODRIGUES, R. C.; DURRANT, L. R.; COSTA, J. A. V. Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediations. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.49, p.29-34. 2006.
- GUNNARD, J., J. WASILESKI e G. ALAN. **Production of Food Colorants by Fermentaion**. EUA, v.Cap. 7. 1994. 205-233 p. (Bioprocess Production of Fragrance and Color Ingredients.)
- HAJJAJ, H., A. KLAEBE, M. O. LORET, et al. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance. **Applied and environmental microbiology**, v.65, n.1, Jan, p.311-314. 1999b.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetics analysis of red pigment and citrinina production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme Microbial Technology**. v.27, p.619-625. 2000a.
- KILIKIAN, B. V. **Produção de Enzimas e Pigmentos por Processos Fermentativos**. Fermentation Technology - Modulo IV 4-14 novembro. UFSC - Florianópolis - SC, 2002. p.
- KILIKIAN, B. V.; OROZCO, S. F. B.; PEREIRA, D. G. Influência do pH na produção de pigmentos vermelhos e na morfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em cultivo submerso. In: Simpósio Nacional de Fermentações, 4, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: UFSC, 2003.
- KUJUMDZIEVA, A. V., J. N. HALLET, V. SAVOV, et al. *Monascus purpureus* strain producer of pigments and by-products. **Journal of Cleaner Production**, v.5, p.115-123. 1997.
- LEE, Y., D. CHEN, S. CHAUVATCHARINS, et al. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. **Journal Fermented Bioengineering**, v.79, p.516-518. 1995.

- LIN, T. F., G. H. YAKUSHIJIN e A. L. DEMAÏN. Formation of water-soluble *Monascus* pigments red by biological and semi-synthetic process. **Journal Industrial Microbiology**, v.9, p.173-179. 1992.
- LOPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S. M.; ARGAIZ, A. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. **Food Microbiology**. v.14, p.117-124. 1997.
- MORITZ, D. E. **Estudo da produção de pigmentos alimentares por *Monascus ruber* CCT3802 em cultivo submerso**. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Centro Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, SC. 2005.
- NAGEL, F. J.; OOSTRA, J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Improved model system for solidsubstrate fermentation: effects on pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. **Process Biochemistry**. v.35, n.1, p.69-75. 1999.
- SANTOS-SILVA, C. O uso dos líquenes e cogumelos em tinturaria. **Pigmentos e corantes naturais: entre as artes e as ciências**. Évora, PT. p. 173-184. 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10174/2616>>. Acesso em: 11 jun. 2011.
- VENDRUSCOLO, F. **Produção de pigmentos vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* CCT 3802**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, SC. 2009.