

Rose Marie Meinicke Bühler

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Monascus ruber*
UTILIZANDO CO-PRODUTOS
DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Florianópolis – SC
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Meinicke Bühler, Rose Marie

Produção de pigmentos por *Monascus ruber* utilizando co-
produtos da produção do biodiesel / Rose Marie Meinicke
Bühler ; orientador, Jorge Luiz Ninow - Florianópolis, SC,
2013.

182 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

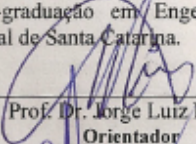
1. Engenharia de Alimentos. 2. *Monascus ruber*. 3.
Biopigmentos. 4. Glicerina. 5. Biodiesel. I. Ninow, Jorge
Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

“PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Monascus ruber* UTILIZANDO CO-PRODUTOS DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL”

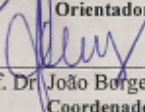
Por

Rose Marie Meinicke Bühler

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

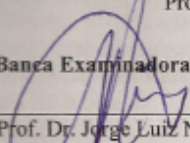


Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador

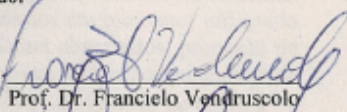


Prof. Dr. João Borges Laurindo
Coordenador

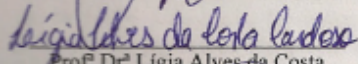
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow



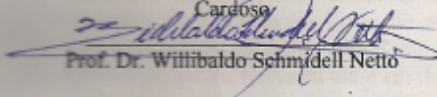
Prof. Dr. Franciello Vendruscolo



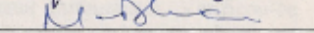
Prof. Dr. Lígia Alves da Costa
Cardoso



Prof. Dr. Denise Esteves Moritz



Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto



Prof. Dr. Marco Di Luccio

Florianópolis, 05 de abril de 2013.

RESUMO

O biodiesel é um combustível renovável e sua produção encontra-se em crescimento, tendo como consequência a geração de subprodutos como a glicerina bruta. Visando reduzir problemas ambientais por acumulação de glicerina e tornar a produção de biodiesel mais rentável, utilizou-se glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-destilada derivadas da produção de biodiesel, de indústrias nacionais, como substratos para a obtenção de bioprodutos de maior valor agregado. *Monascus ruber* é um fungo filamentosos que produz pigmentos, principalmente vermelhos, os quais são utilizados para a coloração de alimentos como arroz, vinho e produtos cárneos. Os corantes são considerados essenciais na indústria de processamento de alimentos e devido ao aumento da restrição do uso de corantes sintéticos, aumentou o interesse no desenvolvimento de pigmentos de fontes naturais. Verificou-se que as glicerinhas bruta, loira e bi-destilada são substratos para o crescimento do *Monascus ruber* e para a produção de pigmentos em placas, frascos de Erlenmeyer aletados e biorreator. Os fatores como a morfologia do fungo, o pH do meio, a aeração, a fonte de nitrogênio e a concentração de substrato influenciaram na produção dos pigmentos, que é parcialmente associada ao crescimento do microrganismo. Em ensaios em biorreator utilizando glicerina bruta, sem tratamento prévio, foram observados: produção de 4,60 g/L de biomassa; 7,03 UA₅₁₀ de pigmento vermelho; produtividade média de 0,117 UA₅₁₀/h; $Y_{X/G}$ de 0,20; $Y_{P/X}$ de 1,60; μ_x de 0,044 h⁻¹ e μ_p de 0,078 UA₅₁₀/g.L. Observou-se inibição no crescimento e na produção de pigmentos em placas e frascos aletados em condições de iluminação direta e maior crescimento e produção de pigmentos em condições de ausência de luz e de menor iluminância. Verificou-se velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* em placas na ausência de luz de 1,50 mm/dia e em iluminação direta de 0,59 mm/dia, o que indica que o fungo apresenta fotorreceptores que influenciam nas respostas fisiológicas. Para aumentar a viabilidade técnica e econômica da obtenção de pigmentos por *Monascus* mostra-se relevante o estudo do metabolismo e da influência dos fatores em cultivo submerso utilizando substratos alternativos, como a glicerina derivada da produção do biodiesel.

Palavras-chave: *Monascus ruber*. Biopigmentos. Glicerina. Biodiesel.

ABSTRACT

Biodiesel is a renewable fuel and its production is growing, resulting in the generation of byproducts such as crude glycerine. In order to reduce environmental problems through accumulation of glycerin and biodiesel production become more profitable was used crude glycerine, blonde glycerine and bi-distilled glycerine derived from biodiesel production as substrates for obtaining molecules with high added value. *Monascus ruber* is a filamentous fungus that produces pigments, especially red ones, which are used for coloring foods such as rice, wine and meat products. Pigments are considered essential in the food processing industry and due restrictions on the use of synthetic dyes, the interest in developing pigments from natural sources are increasing. It was found that purified and crude glycerine are potencial substrates for pigment production and growth of *Monascus ruber* on Petri dishes, Erlenmeyer flasks and bioreactor. Factors such as morphology of the fungus, pH, aeration, nitrogen source and substrate concentration influenced the production of pigments, which is partially associated with the growth of the microorganism. In experiments in bioreactor using crude glycerine, without previous treatment, the following results were obtained: production of 4.60 g/L of biomass; 7.03 UA₅₁₀ of red pigments; productivity of 0.117 UA₅₁₀/h; Y_{X/G} of 0.20; Y_{P/X} of 1.60; μ_x of 0.044 h⁻¹ and μ_P of 0.078 UA₅₁₀/g.L. It was observed inhibition of growth and pigment production on Petri dishes and Erlenmeyer flasks exposed to direct illumination and higher growth and pigment production in the absence of light and red light. The radial growth rate of *Monascus ruber* in plates in the absence of light was 1.50 mm/day and 0.59 mm/day in direct illumination, indicating that the fungus has photoreceptors which influence the physiological responses. To increase the feasibility of obtaining monascus pigments is important to study the metabolism and the influence of factors in submerged cultives using alternative substrates such as glycerine derived from biodiesel production.

Keywords: *Monascus ruber*. Biopigments. Glycerine. Biodiesel.

Quem nos separará do amor de Cristo? Será tribulação, ou angústia, ou perseguição, ou fome, ou nudez, ou perigo, ou espada? Porque eu estou bem certo de que nem morte, nem vida, nem anjos, nem principados, nem cousas do presente, nem do porvir, nem poderes, nem altura, nem profundidade, nem qualquer outra criatura poderá separar-nos do amor de Deus, que está em Cristo Jesus nosso Senhor (Romanos 8.35, 38-39).

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Fluxograma da estrutura do documento.	32
FIGURA 2.1 – Espectro de ondas e cores visíveis. (Fonte: OSRAM, 2012).	33
FIGURA 2.2 – Fluxo luminoso de um lúmen incidindo sobre a área de um metro quadrado produz iluminância de um lux. (Fonte: OSRAM, 2012).	36
FIGURA 2.3 – Estrutura dos principais pigmentos formados pelo gênero <i>Monascus</i> (Fonte: HAJJAJ et al., 1997).	44
FIGURA 2.4 – Via de formação de pigmentos de <i>Monascus</i> . Fonte: HAJJAJ et al. (2000).	45
FIGURA 2.5 – Glicólise em fungos filamentosos (Adaptado de CHAMBERGO ALCALDE, 2002).	51
FIGURA 2.6 – Proteínas fotorreceptoras em fungos (Fonte: IDNURM e HEITMAN, 2005).	53
FIGURA 2.7 – Reação de produção de biodiesel.	56
FIGURA 2.8 – Fluxograma simplificado do processo de produção de biodiesel por transesterificação utilizando catalisador (PARENTE, 2003).	56
FIGURA 2.9 – Aplicações do glicerol (Fonte: MOTA et al., 2009).	60
FIGURA 2.10 – Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos (Fonte: RIVALDI et al., 2007).	67
FIGURA 3.1 – Aspecto visual dos substratos. Da esquerda para a direita: glicerina bruta, glicerina loira, glicerina bi-destilada e glicerol P.A.	69
FIGURA 3.2 – Dimensões e distância da fonte de iluminação ao meio de cultivo em placas de Petri.	75
FIGURA 3.3 – Dimensões e distância da fonte de iluminação ao meio de cultivo em frascos agitados.	75
FIGURA 3.4 – Dimensões e distância da fonte de iluminação ao meio de cultivo em biorreator BIOFLO III.	76
FIGURA 3.5 – Curva de calibração para determinação de glicerol residual no meio de cultivo.	78
FIGURA 4.1 – Crescimento e pigmentação do <i>Monascus ruber</i> em placas de Petri em 336 horas.	87
FIGURA 4.2 – Crescimento e pigmentação do <i>Monascus ruber</i> em placas de Petri em 264 horas.	87

FIGURA 4.3 – Placas de Petri sem filme, parcialmente cobertas com filme preto e cobertas com filme preto, expostas à fonte de iluminação.	89
FIGURA 4.4 – Crescimento de <i>Monascus ruber</i> após 14 dias de incubação em placas contendo meio composto de glicerina bruta, glicina e sais, expostas a iluminância média de 4.952 lux (lâmpada de 15 W). 89	89
FIGURA 4.5 – Crescimento de <i>Monascus ruber</i> após 14 dias de incubação em placas contendo meio composto de glicerina bruta, glicina e sais, expostas a iluminância média de 8.456 lux (lâmpada de 25 W). 89	89
FIGURA 4.6 – Placas de Petri sem filme, parcialmente cobertas com filme preto e cobertas com filme preto, expostas à fonte de iluminação.	90
FIGURA 4.7 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas contendo meio BDA expostas à iluminância média de 4.952 lux (lâmpada de 15 W).	90
FIGURA 4.8 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas contendo meio BDA expostas à iluminância média de 8.456 lux (lâmpada de 25 W).	90
FIGURA 4.9 – Placas de Petri cobertas com filme colorido contendo meio glicerina bruta, glicina e sais. Da esquerda para a direita: filme amarelo, filme verde, filme vermelho e filme azul.	92
FIGURA 4.10 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas contendo meio glicerina bruta, glicina e sais, expostas à lâmpada de 15 W (sequência de filme colorido conforme Figura 4.9).	92
FIGURA 4.11 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas com meio BDA expostas a fonte de iluminação de 25 W e cobertas com filme verde, azul, vermelho e amarelo (conforme sequência da esquerda para a direita).	93
FIGURA 4.12 – Curva de crescimento radial de <i>Monascus ruber</i> em placas cobertas com filme colorido e expostas a iluminância de 4.256 lux.	96
FIGURA 4.13 – Placas inoculadas com <i>Monascus ruber</i> e cobertas com filme colorido. Da esquerda para a direita: filme vermelho, filme verde, filme amarelo, filme azul, filme preto e placa sem filme.	97
FIGURA 4.14 – Produção de pigmentos e crescimento de <i>Monascus ruber</i> em placas cobertas com filme colorido (conforme sequência da Figura 4.13) após 288 horas de exposição à iluminância de 4.256 lux. 97	97
FIGURA 4.15 – Produção de biomassa em cultivos de <i>Monascus ruber</i> em frascos agitados utilizando diferentes substratos.	99

FIGURA 4.16 – Produção de pigmento vermelho (UA ₅₁₀) em cultivos de <i>Monascus ruber</i> em frascos agitados utilizando diferentes substratos.	99
FIGURA 4.17 – Produção de pigmentos em frascos aletados, em 168 horas de cultivo, utilizando os substratos, da esquerda para a direita: glicose, glicerina bruta, glicerina loira, glicerina bi-distilada e glicerol.	100
FIGURA 4.18 – Produção de biomassa em cultivos de <i>Monascus ruber</i> em frascos de <i>Erlenmeyer</i> com diferentes composições de substrato (A = 20 g/L de glicose, B = 20 g/L de glicerina bruta, C = 40 g/L de glicerina bruta, D = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerina bruta, E = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerol).	104
FIGURA 4.19 – Produção de pigmento vermelho em cultivos de <i>Monascus ruber</i> em frascos de <i>Erlenmeyer</i> com diferentes composições de substrato (A = 20 g/L de glicose, B = 20 g/L de glicerina bruta, C = 40 g/L de glicerina bruta, D = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerina bruta, E = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerol).	104
FIGURA 4.20 – Via metabólica de <i>Monascus ruber</i> para formação de pigmentos e biomassa a partir de glicose e glicerol.	107
FIGURA 4.21 – Produção de pigmento vermelho em cultivo de <i>Monascus ruber</i> com diferentes fontes de nitrogênio.	109
FIGURA 4.22 – Produção de biomassa em cultivo de <i>Monascus ruber</i> com diferentes fontes de nitrogênio.	109
FIGURA 4.23 – Produção de pigmentos em 192 horas no cultivo de <i>Monascus ruber</i> com diferentes fontes de nitrogênio. Da esquerda para a direita: glicina 5,0 g/L, glicina 9,0 g/L, peptona 5,0 g/L e GMS 5,0 g/L.	110
FIGURA 4.24 – Produtividade em células e de pigmento vermelho para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em frascos de <i>Erlenmeyer</i> com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio.	110
FIGURA 4.25 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> com pH inicial 2,5.	112
FIGURA 4.26 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> com pH inicial 4,5.	112
FIGURA 4.27 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> com pH inicial 5,5.	113
FIGURA 4.28 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> com pH inicial 8,5.	113
FIGURA 4.29 – Cultivo submerso de <i>Monascus ruber</i> em frascos aletados cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação contínua.	116

FIGURA 4.30 – Frascos aletados cobertos com filme colorido. Da esquerda para a direita: frasco sem filme (iluminação direta), filme amarelo, filme verde, filme azul, filme vermelho e filme preto.....	117
FIGURA 4.31 – Produção de pigmentos em 216 horas de cultivo de <i>Monascus ruber</i> em frascos aletados cobertos com filme colorido conforme seqüência na Figura 4.30.	117
FIGURA 4.32 – Produção de pigmentos vermelhos em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em frascos agitados cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação (lâmpada fluorescente de 15 W).	118
FIGURA 4.33 – Formação de biomassa em cultivos de <i>Monascus ruber</i> em frascos agitados cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação (lâmpada fluorescente de 15 W).....	118
FIGURA 4.34 – Produção de pigmentos, biomassa e variação do pH em frasco coberto com filme vermelho e exposto à fonte de iluminação (lâmpada de 15 W).....	120
FIGURA 4.35 – Amostras do meio de cultivo de <i>Monascus ruber</i> exposto à fonte de iluminação de 25 W, conforme seqüência da esquerda para a direita: iluminação direta (sem filme), filme azul, filme verde, filme vermelho e filme preto (ausência de luz).	121
FIGURA 4.36 – Variação da cor (medida em absorbância relativa) em função do tempo (h) nos frascos expostos à fonte de iluminação e cobertos com filme colorido.	123
FIGURA 4.37 – Produção de biomassa e pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator contendo 20 g/L de glicose como substrato.....	125
FIGURA 4.38 – Produção de biomassa e de pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator contendo 20 g/L de glicerina bruta como substrato.	125
FIGURA 4.39 – Produção de biomassa e de pigmento vermelho em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator contendo 20 g/L de glicerina loira como substrato.	126
FIGURA 4.40 – Produção de biomassa e pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator contendo 20 g/L de glicerina bi-destilada como substrato.	126
FIGURA 4.41 – Produção de biomassa e pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator contendo 20 g/L de glicerol como substrato.....	127
FIGURA 4.42 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> realizado com 20 g/L de glicose como substrato.	134

FIGURA 4.43 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato.	134
FIGURA 4.44 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> realizado com 20 g/L de glicerina loira como substrato.	135
FIGURA 4.45 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> realizado com 20 g/L de glicerina bi-destilada como substrato.	135
FIGURA 4.46 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> realizado com 20 g/L de glicerol sintético como substrato.	136
FIGURA 4.47 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> realizado com 10 g/L de glicerina bruta como substrato.	136
FIGURA 4.48 - $\mu_p \times \mu_x$ de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicose.	138
FIGURA 4.49 – $\mu_p \times \mu_x$ de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta.	138
FIGURA 4.50 – $\mu_p \times \mu_x$ de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina loira.	139
FIGURA 4.51 – $\mu_p \times \mu_x$ de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bi-destilada.	139
FIGURA 4.52 – $\mu_p \times \mu_x$ de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicerol.	140
FIGURA 4.53 – $\mu_p \times \mu_x$ de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 10 g/L de glicerina bruta.	140
FIGURA 4.54 – $\mu_p \times \mu_x$ da produção de pigmento vermelho por <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 10 g/L de glicerina bruta e 10 g/L de glicose.	141
FIGURA 4.55 – $\mu_p \times \mu_x$ da produção de pigmento vermelho por <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 5 g/L de glicerina bruta e 5 g/L de glicose.	141
FIGURA 4.56 – Meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação em biorreator. Da esquerda para a direita: luz azul, luz branca (direta), luz vermelha e ausência de luz.	142
FIGURA 4.57 – Fonte de iluminação para ensaios em biorreator.	142
FIGURA 4.58 – Produção de biomassa em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.	143

FIGURA 4.59 – Produção de pigmento vermelho em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.	144
FIGURA 4.60 – Variação do pH em cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.	144
FIGURA 4.61 – Velocidades específicas de crescimento de <i>Monascus ruber</i> em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.	146
FIGURA 4.62 – Velocidades específicas de produção de pigmento vermelho por <i>Monascus ruber</i> em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.	146
FIGURA 1A – Aumento de 100 X das colônias de <i>Monascus ruber</i> em placas cobertas com filme colorido e expostas à fonte de iluminação (lâmpada de 15 W).	173
FIGURA 2A – Aumento de 100 X das colônias de <i>Monascus ruber</i> em placas cobertas com filme colorido e expostas à fonte de iluminação (lâmpada de 25 W).	173
FIGURA 1B – Resultado para análise de variância e Teste de Tukey para os resultados da velocidade de crescimento radial em placas cobertas com filme colorido.	175
FIGURA 1C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicose como substrato em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	177
FIGURA 2C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	177
FIGURA 3C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina loira como substrato em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	177
FIGURA 4C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bi-destillada como substrato em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	178
FIGURA 5C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerol como substrato em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	178
FIGURA 1D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de <i>Erlenmeyer</i> submetido à fonte de iluminação contínua (sem filme).	179
FIGURA 2D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de <i>Erlenmeyer</i>	

submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme amarelo.	179
FIGURA 3D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de <i>Erlenmeyer</i> submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme verde.	179
FIGURA 4D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de <i>Erlenmeyer</i> submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme azul..	180
FIGURA 5D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de <i>Erlenmeyer</i> submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme vermelho.....	180
FIGURA 6D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de <i>Erlenmeyer</i> submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme preto.	180
FIGURA 1E – Fator de conversão de substrato em biomassa para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicose como substrato.	181
FIGURA 2E – Fator de conversão de substrato em pigmento vermelho para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicose como substrato.	181
FIGURA 3E – Fator de conversão de biomassa em pigmento vermelho para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicose como substrato.	181
FIGURA 4E – Fator de conversão de substrato em biomassa para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta como substrato.	182
FIGURA 5E – Fator de conversão de substrato em pigmento vermelho para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta como substrato.	182
FIGURA 6E – Fator de conversão de biomassa em pigmento vermelho para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta como substrato.	182

ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

TABELA 2.1 – Intervalos de comprimentos de onda, cor absorvida e cores complementares.	34
QUADRO 2.1 – Tonalidades de cores disponíveis de corantes naturais para alimentos.	38
QUADRO 2.2 – Pigmentos naturais derivados de plantas.	39
QUADRO 2.3 – Fontes biotecnológicas para produção de biopigmentos para uso em alimentos.	41
QUADRO 2.4 – Substratos utilizados para a produção de pigmentos de <i>Monascus</i> através de processos biotecnológicos.	49
TABELA 2.2 – Valores encontrados na literatura para propriedades físico-químicas de glicerina obtida do processo de produção de biodiesel.	59
QUADRO 2.5 – Metabólitos produzidos por microrganismos utilizando glicerina bruta como substrato.	64
TABELA 3.1 – Concentração de substrato para determinação da velocidade de crescimento radial do <i>Monascus ruber</i> em placas de Petri.	71
TABELA 3.2 – Composição de sais para os meios de cultivo e inóculos.	72
TABELA 4.1 – Propriedades físico-químicas das amostras de glicerina e glicerol utilizadas no presente trabalho.	83
TABELA 4.2 - Valores médios dos raios das colônias.	85
TABELA 4.3 – Equação linear para o crescimento de <i>Monascus ruber</i>	86
TABELA 4.4 – Valores de iluminância média (<i>Em</i>) e temperatura de incubação.	88
TABELA 4.5 – Valores de Iluminância média (<i>Em</i>) determinadas para o interior das placas cobertas com filme colorido.	91
TABELA 4.6 – Equação linear para o crescimento de <i>Monascus ruber</i> em placas cobertas com filme colorido e expostas a 4.256 lux de iluminância.	96
TABELA 4.7 – Grandezas cinéticas do cultivo de <i>Monascus ruber</i> em frascos utilizando diferentes substratos.	102
TABELA 4.8 – Composição do substrato utilizado no cultivo de <i>Monascus ruber</i> em frascos agitados.	103
TABELA 4.9 – Grandezas cinéticas do cultivo de <i>Monascus ruber</i> em frascos com diferentes concentrações e composição de substrato.	106
TABELA 4.10 – Concentração e fontes de nitrogênio avaliadas.	108

TABELA 4.11 – Valores de iluminância média (E_m) no interior dos frascos de <i>Erlenmeyer</i> cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação.....	116
TABELA 4.12 – Grandezas cinéticas de cultivo de <i>Monascus ruber</i> em frascos de <i>Erlenmeyer</i> cobertos com filme colorido.....	119
TABELA 4.13 – Produtividade e produção de pigmentos vermelhos nos frascos agitados expostos à fonte de iluminação (lâmpada fluorescente compacta de 25 W).	120
TABELA 4.14 – Valores de iluminância média (E_m) no interior dos frascos de <i>Erlenmeyer</i> cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação (lâmpada de 15 W).	123
TABELA 4.15 – Grandezas cinéticas de cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando 20 g/L de substrato.	128
TABELA 4.16 – Fatores de conversão do cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator variando o substrato.	129
TABELA 4.17 – Grandezas cinéticas de cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator utilizando diferentes concentrações de glicerina bruta e/ou glicose.	130
TABELA 4.18 – Máximas velocidades específicas de crescimento (μ_x), produção de pigmentos vermelhos (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) para o cultivo de <i>Monascus ruber</i> em biorreator variando o substrato.	132
TABELA 4.19 – Iluminância média (E_m) determinada na superfície do meio de cultivo, no interior do biorreator.	143
TABELA 4.20 – Grandezas cinéticas de cultivo de <i>Monascus ruber</i> em ensaios com biorreator submetidos a distintas condições de iluminação.	145

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3,5 - DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATP	Trifosfato de adenosina
B ₂	2% de biodiesel no diesel
B ₅	5% de biodiesel no diesel
B ₁₀₀	Biodiesel puro
BDA	Batata Dextrose Ágar
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
CoA	Coenzima A
FCC	Food Chemicals Codex
GMS	Glutamato monossódico
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
lx	Lux
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PYD	Peptona-extrato de levedura-dextrose
TCA	Via dos ácidos tricarbóxicos
UA	Unidade de Absorbância
UI	Unidade Internacional
USP	United States Pharmacopéia
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

θ	Constante empírica que descreve a dependência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular
β	Constante empírica que descreve a independência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular
G	Concentração de glicerol (g/L)
P	Quantidade de pigmentos (UA)
S	Concentração de glicose (g/L)
X	Concentração de biomassa (g/L)
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica de crescimento durante a fase exponencial (h^{-1})
μ_P	Velocidade específica de formação de produto (UA/g.h)
μ_S	Velocidade específica de consumo de substrato (g/g.h)
μ_X	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
k	Constante de velocidade de degradação (h^{-1})
$P_{\text{células}}$	Produtividade média de biomassa (células) (g/L.h)
P_M	Produtividade média de pigmentos (UA/h)
r	Raio da colônia (mm)
R^2	Coefficiente de correlação
t	Tempo (h)
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida (h)
V_{CR}	Velocidade de crescimento radial
$Y_{P/G}$	Fator de conversão de glicerol em pigmentos
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de glicose em pigmentos
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de glicose em biomassa
$Y_{X/G}$	Fator de conversão de glicerol em biomassa
$Y_{P/X}$	Fator de conversão de biomassa em pigmentos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 OBJETIVO GERAL	31
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
1.3 ESTRUTURA DO DOCUMENTO.....	32
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 COR E LUZ.....	33
2.2 PIGMENTOS NATURAIS	36
2.3 <i>Monascus ruber</i>	41
2.4 PIGMENTOS DE <i>Monascus</i>	43
2.5 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR <i>Monascus spp.</i>	47
2.6 INFLUÊNCIA DA LUZ NA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS .	52
2.7 BIODIESEL.....	55
2.8 PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL.....	57
2.9 GLICEROL	58
2.10 PURIFICAÇÃO DA GLICERINA	61
2.11 CONVERSÃO BIOTECNOLÓGICA DA GLICERINA OBTIDA DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL	62
2.12 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
3 MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1 MICRORGANISMO	69
3.2 SUBSTRATO	69
3.3 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM PLACAS.....	70
3.3.1 Determinação da velocidade de crescimento radial	70
3.3.2 Influência da intensidade luminosa	71
3.4 CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS ALETADOS.....	72
3.5 CULTIVO EM BIORREATOR	73
3.6 INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA	74

3.7 ESTABILIDADE À LUZ.....	76
3.8 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	77
3.8.1 Determinação da biomassa.....	77
3.8.2 Quantificação dos pigmentos	77
3.8.3 Determinação do pH.....	77
3.8.4 Determinação da glicose	77
3.8.5 Determinação do glicerol.....	78
3.8.6 Parâmetros cinéticos.....	79
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GLICERINA ...	83
4.2 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM PLACAS DE PETRI	84
4.2.1 Determinação da velocidade de crescimento radial em placas contendo diferentes substratos	84
4.2.2 Influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos.....	88
4.2.3 Influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos em placas cobertas com filme colorido	91
4.2.3.1 Observação em microscópio.....	94
4.2.4 Determinação da velocidade de crescimento radial em placas cobertas com filme colorido e expostas a fonte de iluminação.....	95
4.3 CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS ALETADOS E AGITADOS.....	98
4.3.1 Avaliação dos substratos glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-destillada para o crescimento e a produção de pigmentos por <i>Monascus ruber</i>	98
4.3.2 Influência da fonte de nitrogênio em cultivos utilizando glicerina bruta como substrato	108
4.3.3 Influência do pH do meio em cultivos utilizando glicerina bruta como substrato	111
4.3.4 Influência da intensidade luminosa em cultivo submerso de <i>Monascus ruber</i>	115
4.3.4.1 Estabilidade da cor à luz.....	122
4.4 CULTIVO EM BIORREATOR	124

4.4.1 Avaliação dos substratos glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-destillada para o crescimento e a produção de pigmentos por <i>Monascus ruber</i>	124
4.4.2 Influência da intensidade luminosa na produção de pigmentos e no crescimento de <i>Monascus ruber</i>	142
5 CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS	151
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	171
APÊNDICE A – Imagens das colônias de <i>Monascus ruber</i>	173
APÊNDICE B – Resultado Teste de Tukey	175
APÊNDICE C – Cálculo do $\mu_{\text{máx}}$	177
APÊNDICE D – Cálculo do $\mu_{\text{máx}}$	179
APÊNDICE E – Cálculo dos parâmetros cinéticos	181

1 INTRODUÇÃO

As cores são adicionadas aos alimentos 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) e para conferir cor aos desprovidos de cor (CONSTANT et al., 2002).

Os aditivos sintéticos como cores derivadas de minerais (chumbo e sulfato de cobre, por exemplo) podem causar graves problemas à saúde. Por essa razão, os consumidores mostram rejeição a esses produtos, preferindo os corantes naturais (DUFOSSÉ, 2006; CHATTOPADHYAY et al., 2008).

Pigmentos naturais são derivados de fontes como plantas, insetos e microrganismos. Para serem comercializados como corantes naturais devem ser observados a estabilidade, o rendimento e o preço, pois muitos deles são sensíveis ao pH, calor e luz solar (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

O uso de fungos filamentosos como fontes de corantes para alimentos tem um longo uso no Oriente, porém, ainda é proibido no Ocidente, exceto a produção bem sucedida de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea* (DUFOSSÉ, 2006). A literatura disponível sobre fungos produtores de pigmentos para alimentos fala sobre o gênero *Monascus*, que produz pigmentos que são bons corantes devido à estabilidade na faixa de pH de 2 a 10, estabilidade ao calor e por exibir diferentes cores (MAPARI et al., 2005), podendo ser adicionado para aumentar a coloração em produtos cárneos, substituindo os sais de nitrito e de nitrato (FABRE et al., 1993; BARANOVA et al., 2004).

Espécies de *Monascus* podem produzir pigmentos amarelos, laranja e vermelhos. Alguns pigmentos produzidos por *Monascus* spp. são intracelulares e insolúveis em água e as condições de cultivo (especialmente relacionadas com fonte de nitrogênio, pH e concentração de O₂ dissolvido) podem resultar na formação de pigmentos extracelulares e solúveis em água (HAJJAJ et al., 1999).

Outro fator importante é a luz, que pode regular o desenvolvimento e os processos fisiológicos nos organismos, sendo ampla a capacidade de resposta e sensibilidade à luz em animais, plantas, fungos e bactérias (LINDEN, 2002). No reino dos fungos, a luz pode regular o crescimento, a direção desse crescimento, a reprodução sexuada ou assexuada e a formação de pigmentos, que são aspectos

muito importantes para a sobrevivência e a disseminação dessas espécies (MIYAKE et al., 2005).

Os pigmentos extracelulares são preferidos, pois são solúveis no meio de cultivo e os processos de *downstream* são mais simples e baratos (VELMURUGAN et al., 2010). O desenvolvimento de processos de menor custo para a produção dos pigmentos naturais é um dos desafios para viabilizar a produção destes em larga escala. O custo do substrato tem uma contribuição importante no custo global de produção e pode ser minimizado usando resíduos orgânicos de baixo custo (CONSTANT et al., 2002).

A produção de pigmentos por *Monascus* em cultivo submerso tem sido pesquisada utilizando como principal substrato a glicose. Porém, existem estudos que relatam a utilização de substratos alternativos para a produção dos pigmentos, como etanol (HAMDI et al., 1997) e resíduos. Os pigmentos vermelhos têm sido obtidos a partir de cultivos em meio sólido de mandioca, farelo de arroz e aveia (BABITHA et al., 2006) e de cultivos submersos de melaço de milho (HAMANO e KILIKIAN, 2006), farinha de trigo (DOMINGUEZ-ESPINOSA e WEBB, 2003), farinha de casca de camarão e caranguejo (WANG et al., 2002), suco de pêra (HAMDI et al., 1996), bagaço de uva proveniente da indústria de vinhos (SILVEIRA et al., 2008) e de farelo de arroz (MORITZ, 2005).

O biodiesel é produzido pela transesterificação de um triglicerídeo com um monoálcool (metanol ou etanol) produzindo um éster alquílico de ácido graxo. Como subproduto dessa reação, formam-se cerca de 10% de glicerina. O grande volume de glicerina oriunda da produção de biodiesel, tanto no Brasil como no mundo, é uma fonte abundante e barata de uma matéria-prima renovável (MOTA et al., 2009).

A bioconversão da glicerina possui interesse industrial e a sua utilização como uma nova fonte de carbono para o crescimento microbiano é uma das possibilidades mais promissoras de aproveitamento deste subproduto. O estudo, a caracterização e a identificação de microrganismos que cresçam eficientemente em glicerina e produzam substâncias de interesse industrial constituem importante etapa visando à descoberta de novas aplicações para esse resíduo (SILVA et al., 2009).

A glicerina é utilizada com sucesso como fonte de carbono solúvel em água para a produção de uma série de metabólitos microbianos de interesse. Enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Clostridium* podem degradar o glicerol e produzir o 1,3-propanodiol. A produção de biosurfactantes de interesse

por microrganismos como *Pseudozyma antarctica*, *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus circulans*, *Candida bombicola* e *Pseudomonas aeruginosa* também é viável utilizando-se glicerina proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono (AMARAL et al., 2009).

Estudos relativos à utilização da glicerina como fonte de carbono por fungos e leveduras se referem à produção de biomassa e várias proteínas extracelulares e intracelulares por *Pichia* spp., produção de α -amilase por *Yarrowia lipolytica* recombinante e biomassa e α -caroteno por *Rhodotorula lactosa* (WANG et al., 2001).

Com o crescimento da produção de biodiesel há, portanto, a necessidade de desenvolvimento de novas aplicações para a glicerina e expansão das aplicações já existentes, sendo a produção de pigmentos de *Monascus* uma alternativa aos corantes sintéticos para alimentos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o crescimento e a produção de pigmentos em cultivos de *Monascus ruber* CCT 3802, utilizando co-produtos da produção do biodiesel como substratos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterizar as amostras de glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-destilada utilizadas como substrato.

b) Determinar a velocidade de crescimento radial de *Monascus ruber* em placas de Petri contendo diferentes substratos.

c) Estudar a produção de pigmentos e de biomassa em frascos de *Erlenmeyer* aletados utilizando os co-produtos do biodiesel (glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-destilada) como substratos e comparar com outras fontes: glicose e glicerol sintético.

d) Verificar a influência da fonte de nitrogênio e do pH inicial no meio de cultivo no crescimento e na produção de pigmentos em frascos aletados contendo glicerina bruta como substrato.

e) Estudar a produção de pigmentos e de biomassa em biorreator de 6 L, com volume útil de 4 L, utilizando os co-produtos do biodiesel (glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-destilada) como substratos e comparar com outras fontes: glicose e glicerol sintético.

f) Obter os parâmetros cinéticos da produção de pigmentos e de biomassa em cultivos submersos utilizando os diferentes tipos de glicerina como substratos.

g) Avaliar a influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos por *Monascus ruber* em placas, frascos aletados e biorreator.

h) Verificar a estabilidade à luz dos pigmentos produzidos por *Monascus ruber*.

1.3 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

O documento está dividido em 5 capítulos, conforme Fluxograma apresentado na Figura 1.1.

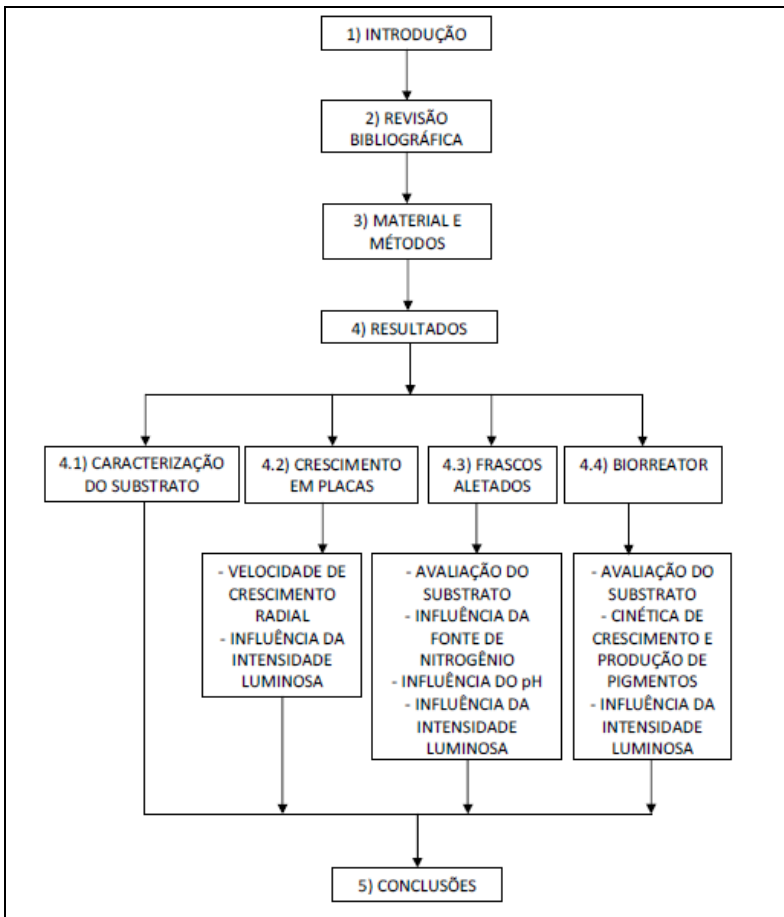


FIGURA 1.1 – Fluxograma da estrutura do documento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COR E LUZ

A cor influencia nas características sensoriais e tem sido adicionada para manter a aparência original dos alimentos após processamento e estocagem, para assegurar a uniformidade na coloração de alimentos sazonais, para aumentar a coloração natural, manter a qualidade e proteger as vitaminas sensíveis à luz (DUFOSSÉ et al., 2005; CHATTOPADHYAY et al, 2008). A cor para o consumidor é um importante fator para a seleção do produto final, tornando os pigmentos importantes na indústria de alimentos (BOO et al., 2012).

O espectro eletromagnético é composto por vários tipos de radiação, como a luz, os raios gama, os raios X e as ondas de rádio. A luz visível corresponde à região do espectro eletromagnético que é percebida pelo olho humano e cujo comprimento de onda varia, para a maioria da população, entre 380 e 780 nm (Figura 2.1).

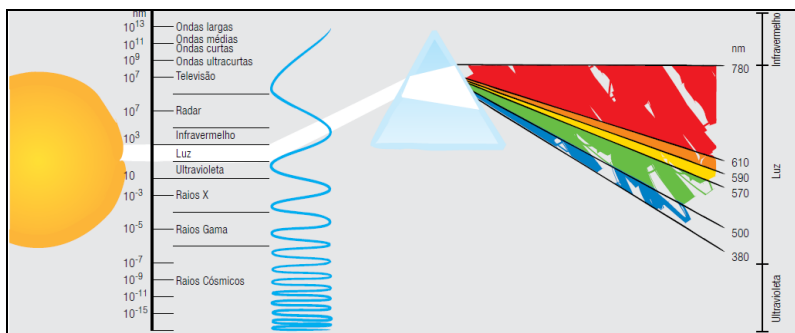


FIGURA 2.1 – Espectro de ondas e cores visíveis. (Fonte: OSRAM, 2012).

A cor é um fenômeno óptico provocado pela ação de um feixe de fótons sobre células especializadas da retina, que transmitem através de informação pré-processada no nervo ótico, impressões para o sistema nervoso. É determinada pelas médias de frequência das faixas de onda que as suas moléculas constituintes refletem. Um objeto terá determinada cor se não absorver justamente os raios correspondentes à frequência daquela cor, sendo a aparência de um objeto resultante da iluminação incidente sobre ele. Por exemplo, sob uma luz branca, a maçã aparenta ser de cor vermelha, pois ela tende a refletir a porção do

vermelho do espectro de radiação, absorvendo a luz nos outros comprimentos de onda.

Cada cor corresponde a uma parcela dessa faixa de comprimento de onda. O menor comprimento de onda do espectro visível corresponde à cor violeta e a maior à cor vermelha. As cores que percebemos são o resultado da resposta fisiológica e psicológica do sistema olho-cérebro aos diferentes comprimentos de onda (e diferentes frequências) (TIPLER, 2000).

Os compostos orgânicos podem absorver o espectro eletromagnético, pois contêm elétrons de valência que podem ser excitados a níveis de energia mais altos. Ao absorver uma energia incidente, seja ela visível ou não, a molécula sofre uma transição eletrônica, ocorrendo a promoção de elétrons de seu estado fundamental para um estado excitado. No caso de um corante absorver a luz visível, ele vai emitir o complemento da cor absorvida. A Tabela 2.1 apresenta as cores absorvidas e observadas em função de seu intervalo de comprimento de onda.

TABELA 2.1 – Intervalos de comprimentos de onda, cor absorvida e cores complementares.

Intervalo de comprimento de onda (nm)	Cor absorvida	Cor complementar (observada)
380 – 435	Violeta	Amarelo esverdeado
435 – 480	Azul	Amarelo
480 – 490	Azul esverdeado	Laranja
490 – 500	Verde azulado	Vermelho
500 – 560	Verde	Roxo
560 – 580	Verde amarelado	Violeta
580 – 595	Amarelo	Azul
595 – 605	Laranja	Azul esverdeado
605 – 780	Vermelho	Verde azulado

A luz é uma radiação eletromagnética, composta por fluxos de fótons que carregam quantidades discretas de energia, em movimento ondulatório, e que obedecem à seguinte relação: $E_{\text{fótons}}(\lambda) = hc/\lambda$, onde h é a constante de Planck ($6,34 \times 10^{-34}$ J.s), c é a velocidade da luz e λ é o comprimento da onda. A luz pode ser definida como a radiação que

pode ser percebida pelos órgãos visuais (HALLIDAY e RESNICK, 1973).

A luz é uma faixa de radiação eletromagnética, com comprimento de onda entre 380 a 780 nm (nanômetros), ou seja, da cor ultravioleta à vermelha, passando pelo azul, verde, amarelo e roxo. As cores azul, vermelho e verde, quando somadas em quantias iguais, definem o aspecto da luz branca. A sensibilidade visual para a luz varia não só de acordo com o comprimento de onda da radiação, mas também com a luminosidade. A curva de sensibilidade do olho humano demonstra que radiações de menor comprimento de onda (violeta e azul) geram maior intensidade de sensação luminosa quando há pouca luz (ex: crepúsculo, noite, etc.), enquanto as radiações de maior comprimento de onda (laranja e vermelho) se comportam ao contrário. O olho humano possui diferentes sensibilidades para a luz. Durante o dia, nossa maior percepção se dá para o comprimento de onda de 550 nm, correspondente às cores amarelo-esverdeadas. Já durante a noite, para o de 510 nm, correspondente às cores verde-azuladas (OSRAM, 2012).

A iluminância (iluminamento ou intensidade de iluminação) é uma grandeza de luminosidade, que faz a relação entre o fluxo luminoso que incide na direção perpendicular a uma superfície e a sua área. A unidade da iluminância é o lux (lx) e na prática, é a quantidade de luz dentro de um ambiente e pode ser determinada com auxílio de um luxímetro (MAMEDE FILHO, 2001).

A luz que uma lâmpada irradia, relacionada à superfície à qual incide, define a grandeza luminotécnica denominada iluminância. Como o fluxo luminoso não é distribuído uniformemente, a iluminância não será a mesma em todos os pontos da área em questão. Considera-se, por isso, a iluminância média (E_m) (OSRAM, 2012).

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) descreve iluminância como o limite da razão do fluxo luminoso recebido pela superfície em torno de um ponto considerado para a área da superfície quando esta tende para o zero. Fluxo luminoso é a radiação total emitida em todas as direções por uma fonte luminosa ou fonte de luz que pode produzir estímulo visual. Sua unidade é o lúmen (lm). O fluxo luminoso também pode ser definido como a potência de radiação emitida por uma determinada fonte de luz e avaliada pelo olho humano (MAMEDE FILHO, 2001).

Assim, se uma superfície plana de $1,0 \text{ m}^2$ é iluminada perpendicularmente por uma fonte de luz, cujo fluxo luminoso é de $1,0 \text{ lúmen}$, apresenta uma iluminância de $1,0 \text{ lux}$ (Figura 2.2), ou seja:

$$E = \frac{F}{S} (\text{lux})$$

F é o fluxo luminoso, em lúmen, e S a área da superfície iluminada, em m^2 . São exemplos de valores de iluminância: dia de sol de verão a céu aberto: (100.000 lux), dia de sol encoberto no verão (20.000 lux), noite de lua cheia sem nuvens (0,25 lux), noite à luz das estrelas (0,001 lux).

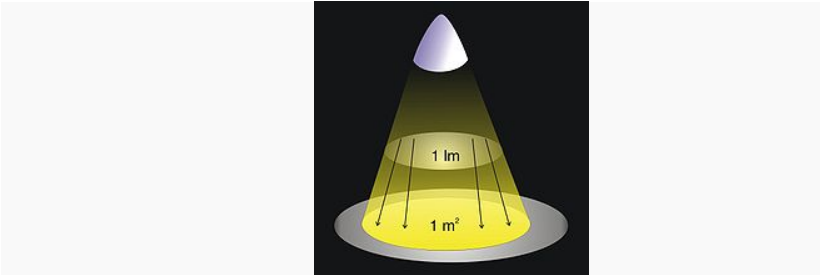


FIGURA 2.2 – Fluxo luminoso de um lúmen incidindo sobre a área de um metro quadrado produz iluminância de um lux. (Fonte: OSRAM, 2012).

O fluxo luminoso inicial para lâmpadas fluorescentes com potência de 20 W é de 1.200 lúmen e para lâmpadas de 40 W é de 3.000 lúmen (MAMEDE FILHO, 2001). As lâmpadas se diferenciam pelos diferentes fluxos luminosos que irradiam e pelas diferentes potências que consomem (OSRAM, 2012).

2.2 PIGMENTOS NATURAIS

Corantes alimentares podem ser classificados em sintéticos, idênticos aos naturais, inorgânicos e corantes naturais. Corantes naturais para alimentos são obtidos de fontes renováveis. Na maioria das vezes, os corantes são extraídos de plantas, mas outras fontes como insetos, algas, ciano-bactérias e fungos também são usadas. Corantes naturais são normalmente extraídos e concentrados utilizando água para pigmentos solúveis em água e solventes orgânicos para pigmentos solúveis em óleo, sendo formulados para torná-los mais adequados para uma variedade de alimentos e bebidas e para aumentar a sua estabilidade (ABEROUMAND, 2011).

Corantes sintéticos são pigmentos não encontrados na natureza, e são conhecidos como corantes azo. Corantes inorgânicos são derivados de chumbo, dióxido de titânio, ouro e prata. A maioria dos precursores dos corantes químicos é derivada de produtos petroquímicos, um fato que aumenta a preocupação de consumidores quanto à segurança da ingestão por tempo prolongado dessas substâncias. O aumento da restrição dessas substâncias pode eliminar alguns dos corantes sintéticos aprovados, sendo necessário encontrar fontes alternativas de corantes para alimentos (CONSTANT et al., 2002).

O aumento do interesse e estudo no uso de corantes proibiu o uso de vários corantes sintéticos, que apresentam potencial carcinogênico e teratogênico (BABITHA et al., 2006) e os consumidores estão evitando alimentos que contenham corantes sintéticos, fazendo as indústrias de alimentos substituí-los por pigmentos naturais (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

Corantes naturais são pigmentos produzidos por organismos vivos. A maioria dos pigmentos naturais é extraída de plantas ou de produtos de plantas ou são produzidos por microrganismos. Geralmente, pigmentos obtidos pela modificação de materiais, como caramelo e clorofila, são considerados naturais. Os corantes idênticos aos naturais são pigmentos que também podem ser encontrados na natureza como carotenoides, cantaxantina e riboflavina.

Apesar das estruturas diversificadas e variedade de fontes, os corantes naturais podem ser agrupados em algumas classes: tetrapirróis, tetraterpenoides e flavonoides. O membro mais importante dos tetrapirróis é a clorofila, encontrada em plantas superiores. Carotenoides são tetraterpenoides semelhantes à clorofila, uma vez que são parte do processo de fotossíntese, sendo também responsáveis pela coloração amarelo-laranja-vermelho de muitas frutas. Antocianinas são um grupo de flavonoides que fornecem a coloração vermelho-roxo de muitas frutas como morango, mirtilo e groselha. Outra importante classe de corantes são as antraquinonas (carmim, laca) e as betalainas ou beterraba (DUFOSSE, 2006).

Mudanças na coloração dos alimentos podem estar associadas com o tratamento térmico. Várias reações como destruição dos pigmentos (carotenoides e clorofilas) e reações de escurecimento não enzimático (Maillard) podem ocorrer durante o aquecimento de frutas e vegetais degradando a coloração dos mesmos. A utilização destes pigmentos em alimentos e a monitoração do comportamento da degradação da coloração frente às condições em que são submetidos, como por exemplo, temperatura de processamento, temperatura de

estocagem, tempo de estocagem e fatores ambientais, são pontos cruciais na avaliação de um pigmento que será utilizado em um determinado alimento, garantindo um padrão de qualidade e identidade para um determinado produto alimentício (WONG e KOEHLER, 1981). O Quadro 2.1 apresenta algumas fontes de pigmentos naturais e tonalidades encontradas.

QUADRO 2.1 – Tonalidades de cores disponíveis de corantes naturais para alimentos.

Cor	Comprimento de onda (nm)	Biopigmento	Apresentação do corante	Quantidade de corante
Vermelho	~630 – 700	Beterraba (betanina)	Pó	0,3 a 0,45 %
		Páprica	Emulsão (solúvel em água) ou pó	40.000 UI
		Carmim	Pó	-
Laranja	~590 – 630	Laranja/Manga	Pó	1,5 %
		Urucum (bixina)	Emulsão (solúvel em óleo)	1,5 %
		Urucum (norbixina)	Emulsão (solúvel em água)	1,5%
Amarelo	~560 – 590	Cúrcuma	Pó	5 %
Verde	~490 – 560	Clorofila	Emulsão (solúvel em óleo ou em água)	- -
Azul-violeta	~400 – 490	Antocianinas	Pó	-

Fonte: Chattopadhyay et al. (2008).

Uma variedade de diferentes tipos de componentes, incluindo as antocianinas, carotenoides, betalaínas e clorofilas são derivadas de plantas (Quadro 2.2). Apresentam coloração de vermelho a azul, de acordo com o pH e ocorrem em todos os tecidos de plantas superiores

que fornecem cor em folhas, caule, raízes, flores e frutos. Os carotenoides tetraterpenoides são vermelhos, alaranjados ou amarelos e são conhecidos como caroteno (pigmento laranja), luteína (pigmento amarelo) e licopeno (pigmento vermelho). A clorofila é o pigmento primário que dá cor verde às plantas. Betalainas são pigmentos amarelos ou vermelhos como as antocianinas e são solúveis em água, mas ao contrário de antocianinas, são compostos derivados de indol sintetizados a partir da tirosina. Betalainas são responsáveis pela cor vermelha da beterraba e são usadas comercialmente como alimento e agente colorante (BOO et al., 2012).

QUADRO 2.2 – Pigmentos naturais derivados de plantas.

Fonte	Classificação
<i>Grupo vermelho e roxo</i>	
Batata doce roxa	Antocianinas
Beterraba vermelha	Betalainas
Repolho roxo	Antocianinas
Casca de uva	Antocianinas
<i>Grupo amarelo</i>	
Melão	Carotenoides
Páprica	Carotenoides
Gardênia amarela	Carotenoides
Dedaleira chinesa (flor)	Carotenoides
Casca de cebola	Carotenoides
<i>Grupo preto</i>	
Arroz selvagem	Antocianinas
Amora	Antocianinas
<i>Grupo azul</i>	
Gardênia azul	Flavonoides, iridoides
<i>Grupo verde</i>	
Folha de amoreira	Clorofila

Fonte: BOO et al. (2012).

Pigmentos microbianos são uma alternativa promissora em relação aos outros aditivos extraídos de animais ou vegetais porque eles são considerados naturais, não apresentam problema de sazonalidade e mostram grande produtividade (CARVALHO et al., 2005).

Muitos corantes naturais para alimentos apresentam algumas desvantagens, como a dependência de matéria-prima e a variação na

extração dos pigmentos. Os fungos são uma fonte alternativa para produção de pigmentos naturais em altas concentrações, existindo um grande potencial para produção de corantes nas tonalidades de amarelo a vermelho. A autorização para o uso de corantes derivados de fungos tem incentivado as pesquisas para obtenção biotecnológica de pigmentos para alimentos (MAPARI et al., 2005).

A biotecnologia pode permitir a produção eficiente de corantes. Tecnologias de cultura dos tecidos e células de plantas, processos microbianos e manipulação genética são investigados para a produção dos pigmentos. Em contraste com as plantas, algas unicelulares e fungos são mais suscetíveis para produção biotecnológica porque eles podem ser cultivados usando técnicas de cultivo existentes (WISSGOTT e BORTLIK, 1996). Entre as moléculas produzidas estão carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas e mais especificamente monascinas, violaceínas ou índigo. O Quadro 2.3 apresenta algumas fontes biotecnológicas de corantes naturais, denominados biopigmentos.

Os fungos são usados em muitos processos industriais, como para produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos. Muitas dessas substâncias são produzidas comercialmente e outras apresentam valor potencial para a biotecnologia. Os metabólitos secundários dos fungos são extremamente importantes e apresentam impacto econômico, como os pigmentos naturais produzidos pelos fungos *Monascus purpureus*, *Blakeslea trispora*, *Phaffia rhodozyma*. O *Monascus purpureus* tem sido utilizado para produção de arroz vermelho, vinho, queijo de soja, carnes e peixes e é autorizado para uso em alimentos na China e no Japão. O fungo *Blakeslea trispora* tem sido utilizado para a produção industrial de β -caroteno e a levedura *Phaffia rhodozyma* tem sido considerada a principal fonte microbiana para a produção dos carotenoides astaxantinas (ADRIO e DEMAIN, 2003).

Os corantes obtidos de fermentação usados atualmente são: *Dunaliella salina*, *Blakeslea trispora*, spirulina e *Monascus*. Uma grande variedade de corantes ainda poderá ser obtida combinando manipulação genética e condições de cultivo (ABEROUMAND, 2011).

De acordo com Carvalho et al. (2005), a perda de cor por degradação na indústria de alimentos é comum, justamente por se utilizar pigmentos naturais com frequência. Por isso, pigmentos alternativos, como pigmentos de *Monascus* são um aditivo de cor promissor, dependendo das condições de processo e do tipo de alimento.

QUADRO 2.3 – Fontes biotecnológicas para produção de biopigmentos para uso em alimentos.

Biopigmento	Fonte original	Fonte biotecnológica
Monascus rubramina		<i>Monascus purpureus</i>
Astaxantina	Plantas	Fungos: <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> Algas: <i>Haematococcus lacustris</i> , <i>H. pluvialis</i>
Vermelho arpink		Fungo: <i>Penicillium oxalicum</i> var. <i>armeniaca</i> CCM 8241
β -caroteno	<i>Daccus carota</i>	Fungus: <i>Blakeslea trispora</i> , <i>Phycomyces blakesleeanus</i> car S mutante Algas: <i>Dunaliella salina</i> , <i>D. bardwil</i>
Riboflavina	Leite	Leveduras: <i>Ashbye gossypii</i> , <i>Eremothecium ashbyii</i> , <i>Ashbya gossypi</i>
Cantaxantina		Algas: <i>Haematococcus lacustris</i> Bactéria: <i>Bradyrhizobium</i> sp.
Licopeno	Tomate	Fungo transgênico: <i>Fusarium sporotrichioides</i> Bactéria transgênciã: <i>Erwnia uredovors</i>
Zeaxantina	Milho	Bactéria: <i>Flavobacterium</i> sp.
Isorenierateno		Bactéria: <i>Brevibacterium aurartiacum</i>

Fonte: Adaptado de Chattopadhyay et al. (2008).

2.3 *Monascus ruber*

Monascus ruber van Thiehen é um fungo encontrado na natureza que se desenvolve em amido e está presente em numerosos alimentos. O microrganismo metaboliza celulose, maltose, frutose e glicose, ocorrendo produção de pigmentos conhecidos como pigmentos monascus. Facilmente encontrados em diversos ecossistemas, fungos do gênero *Monascus* são usados tradicionalmente em países orientais, originalmente na China e na Tailândia, no preparo de um arroz de forte

coloração vermelha e que encontra aplicações diversas, desde conferir cor a outros produtos como vinho, queijo e carne, até usos medicinais e como conservador de carne (WONG e KOEHLER, 1981).

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 significância para a indústria alimentícia são: *Monascus ruber*, *Monascus purpureus* e *Monascus pilosus* (BLANC, 1998).

O fungo é constituído por hifas, formadas por células longas e ramificadas de cerca de 5,0 µm de espessura que, em conjunto com outras hifas, formam o micélio. A reprodução assexuada ocorre via formação de conídios e a reprodução sexuada envolve a formação dos ascos. As células são tipicamente constituídas por uma parede tubular de quitina e β-glicanos e são divididas por septos que dão estabilidade às hifas, já que evitam a possibilidade de perda de citoplasma no caso de haver algum dano ou ruptura da membrana celular (CARELS e SHEPHERD, 1975).

Colônias de *Monascus ruber* apresentam um crescimento relativamente rápido, de 20 a 30 mm de diâmetro em sete dias, em meio BDA (Batata Dextrose Agar) à temperatura ambiente. São saprófitas do solo e suas colônias apresentam topografias levemente rugosas, circulares, flocosas, de coloração púrpura e de reverso púrpura. As colônias são planas, eventualmente com pequeno desenvolvimento aéreo, esparsas, com textura superficial floculenta, micélio inicialmente branco (1 a 2 dias), passando para laranja a vermelho pardo à medida que a cultura se desenvolve, com a formação de cleistotécios e aleuriocónídios. Geralmente há formação de pigmentos solúveis que se difundem pelo ágar (PITT e HOCKING, 1999; CARVALHO et al., 2005; PISAREVA e KUJUMDZIEVA, 2006).

As hifas do micélio vegetativo liberam e absorvem substâncias do substrato necessárias à nutrição do fungo e servem também para fixar o fungo a esse substrato. O micélio reprodutivo, responsável pela produção de esporos nas mais variadas formas apresenta alterações morfológicas de acordo com o fungo e a fase de reprodução. O fungo *Monascus ruber* apresenta ascocarpos circulares com cadeias de conídeos isolados ou ligados às hifas (aleuriósporos) (MORITZ, 2005).

A existência de diferentes morfologias de *Monascus ruber*, classificadas como hifas (filamentos dispersos), *clumps* (pequenos aglomerados) e *pellets* (aglomerados maiores e mais densos – grumos), e a possibilidade de formas distintas de crescimento, principalmente relacionados com as características de reprodução (assexuada –

conídeos e sexuada – cleistotécio), induzem à formação de diferentes compostos de interesse industrial, como os pigmentos de *Monascus* (HAMANO et al., 2005).

O arroz vermelho, um produto fermentado a partir de espécies de *Monascus*, que também é conhecido como koji, anka, angkak, e ben-koji, tem sido utilizado na Ásia há mais de 1000 anos, como um aditivo alimentar comum para melhorar a cor dos alimentos e na preservação de carne e peixe (MA et al., 2000). Vários metabólitos foram identificados, tais como pigmentos (HAJJAJ et al., 1999; LIAN et al., 2007), ácido γ -aminobutírico (GABA) e ácido dimerúmico (JUZLOVA et al., 1996), α -amilase e glucoamilase (YOSHIZAKI et al., 2010) e a micotoxina citrinina (BLANC et al., 1995). Estes metabólitos possuem várias funções, incluindo, antioxidante (YANG et al., 2006; KUO et al., 2009), anti-hiperlipidêmica (CHANGLING et al., 1998; CHOE et al., 2012), anti-inflamatória (LEE, C-L. et al., 2006; CHENG et al., 2012), anticarcinogênica (AKIHISA et al., 2005) e com atividade antibacteriana (MARTINKOVA et al., 1995; KONO e HIMENO, 1999; KIM et al., 2006) e anti-fúngica (WANG et al., 2002; CHENG et al., 2011).

2.4 PIGMENTOS DE *Monascus*

Os fungos degradam os substratos em moléculas mais acessíveis para serem absorvidas e assimiladas, relacionadas ao mecanismo de sobrevivência, produzindo substâncias como antibióticos, toxinas e supressores de crescimento de outros organismos. Fungos filamentosos possuem propriedades importantes que desempenham um papel significativo na vida humana e para o ambiente participando na produção de alimentos, substâncias e reciclagem de compostos orgânicos. Seu potencial bioquímico e sua adaptação às condições de vida extremas em meios líquidos tem sido explorados para a produção de moléculas, como os antibióticos (penicilina, cefalosporinas), enzimas (α -amilase, celulase), ácidos orgânicos (ácido cítrico) e corantes alimentares (HAJJAJ et al., 2000).

Pigmentos de *Monascus* são um grupo de metabólitos chamados azafilonas produzidos por diferentes espécies de *Monascus* spp. em diferentes condições de cultivo (BLANC et al., 1995). Os pigmentos de *Monascus* podem ser reduzidos, oxidados e reagem com outros produtos, especialmente aminoácidos, para formar os vários produtos derivados nomeados de pigmentos complexados (HAJJAJ et al., 1999).

Ankaflavina e monascina são pigmentos amarelos, rubropunctatina e monascorubrina são de cor laranja e rubropunctamina e monascorubramina são vermelhos (Figura 2.3). As mesmas cores existem em duas estruturas moleculares diferindo no comprimento das cadeias alifáticas. Esses pigmentos são produzidos principalmente na célula (intracelulares), possuem baixa solubilidade na água, são sensíveis ao calor, estáveis em pH de 2,0 a 10,0 e desbotam na presença de luz (BLANC et al., 1995).

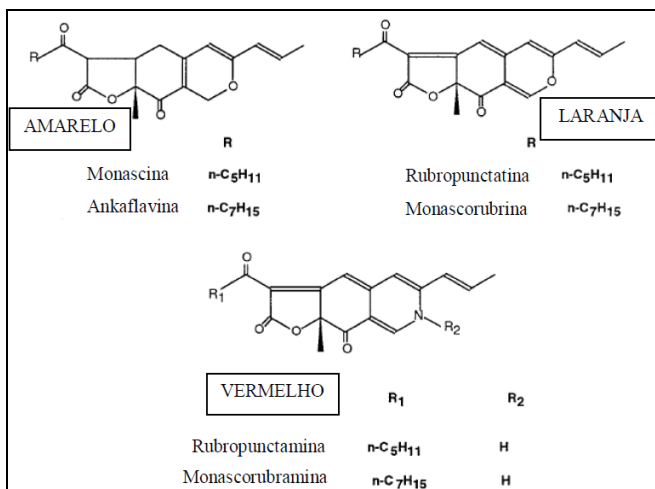


FIGURA 2.3 – Estrutura dos principais pigmentos formados pelo gênero *Monascus* (Fonte: HAJJAJ et al., 1997).

Vários métodos foram patenteados para tornar os pigmentos solúveis em água. O princípio é a substituição de oxigênio em monascorubrininas ou rubropunctatinas por nitrogênio dos grupos amino de vários compostos como aminoácidos, peptídeos e proteínas, mudando a cor de laranja para vermelho (WONG e KOEHLER, 1981).

Os metabólitos produzidos pelo fungo *Monascus* são policetídeos que são formados pela condensação de um acetil Coenzima A com pelo menos um malonil Coenzima A com descarboxilação simultânea (Figura 2.4), como na síntese de lipídeos (HAJJAJ et al., 1999).

Os pigmentos laranja, monascorubrina e rubropunctatina, são sintetizados no citosol a partir de acetil coenzima A através de síntese enzimática de policetídeos. Esses pigmentos apresentam grande afinidade a compostos que contêm grupos amino primários. Reações

com esses aminoácidos formam pigmentos vermelhos solúveis em água. O mecanismo de formação de pigmentos amarelos não está claro, alguns autores acreditam que são formados através da alteração de pigmentos laranja, e outros consideram que apresentam a sua própria via metabólica (JUZLOVA et al., 1996).

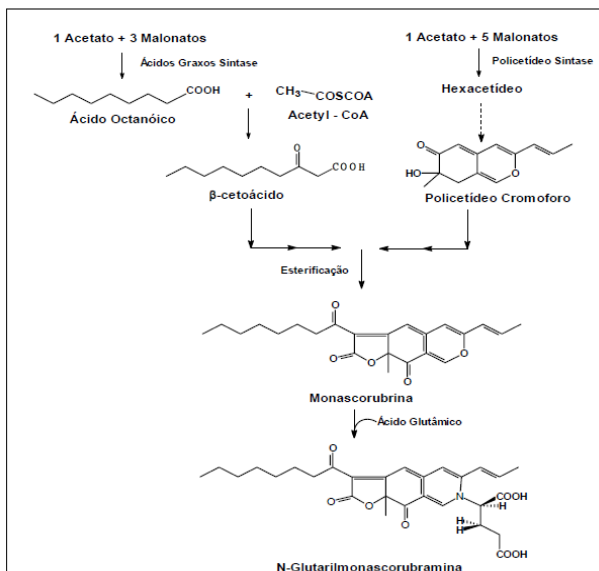


FIGURA 2.4 – Via de formação de pigmentos de *Monascus*. Fonte: HAJJAJ et al. (2000).

Como alguns pigmentos de *Monascus* spp. são instáveis em temperaturas elevadas, luminosidade, presença de oxigênio, íons metálicos e mudanças de pH, eles podem ser aplicados em carnes suínas, de aves e de peixes, e também em tofu para aumentar o aroma e o sabor e a preservação desses produtos (BARANOVA et al., 2004). Podem ser substitutos viáveis aos sais de nitrito e de nitrato para aumentar o sabor e a coloração em produtos cárneos (FABRE et al. 1993).

Aplicações em alimentos, como a coloração de carnes processadas (salsichas e presuntos), produtos marinhos como *kamaboko* (pasta de peixe) e *ketchup* de tomate são descritas (DUFOSSÉ et al., 2005).

De acordo com Fabre et al. (1993), molhos ou patês coloridos com pigmentos vermelhos de *Monascus* apresentam uma cor residual de

92 a 98% após três meses a 4 °C, com boa aceitação sensorial. Os pigmentos são, no entanto, instáveis frente à luz (apenas 20% de cor residual após 50 dias) e calor (45% de cor residual após 2 horas a 100 °C).

Os pigmentos são instáveis em extremos de pH e temperaturas altas. Em pH alto (próximo à neutralidade), o pigmento é estável, devendo ser utilizado em aplicações em temperaturas inferiores a 60 °C. Esse efeito pode ser um problema para o uso de *Monascus* em alimentos ácidos, como iogurte, sugerindo que esses pigmentos podem ser adequados para aplicação em alimentos refrigerados ou bebidas alcoólicas, em que a degradação da cor é menor (CARVALHO et al., 2005).

Os pigmentos de *Monascus* em arroz são também comercializados em cápsulas para a regulação de colesterol e prevenção de doenças como câncer, osteoporose e *Alzheimer*, devido à presença da substância lovastatina (ERDOGRUL e AZIRAK, 2004).

A lovastatina também é conhecida por Mevinolina, Monacolina ou Mevacor, que compete com uma enzima que limita a biossíntese de colesterol. Ela é efetiva na hipercolesterolemia, sendo usada como produto medicinal (CHAN et al., 2002).

O extrato dos pigmentos apresenta, ainda, atividade biológica como ação antibiótica contra bactérias e também contra algumas leveduras e fungos filamentosos (MARTINKOVA et al., 1995).

Estudos envolvendo cultivos submersos têm revelado que juntamente com a produção de pigmentos, *Monascus ruber* excreta uma micotoxina, chamada citrinina, que possui propriedades antibióticas contra bactérias gram-positivas. As propriedades nefrotóxicas e hepatotóxicas dessa toxina ainda comprometem o uso dos pigmentos vermelhos como corantes naturais de alimentos nos países do Ocidente, sendo necessários estudos bioquímicos e genéticos para prevenir a formação de citrinina (BLANC et al., 1995).

Conforme a legislação japonesa, a concentração de citrinina em pigmentos de *Monascus* utilizados em alimentos deve ser menor que 0,02 µg/g, sendo necessários estudos para diminuir a produção de citrinina e aumentar os parâmetros de produção de pigmentos vermelhos utilizados como aditivos em alimentos (LIN et al., 2008).

Trabalhos recentes têm estudado a eliminação da produção de citrinina através de engenharia genética e mutagênese (JIA et al., 2010), uso de diferentes cepas em cultivos em substrato sólido (PATTANAGUL et al., 2008) e adição de ácidos graxos, como o ácido octanoico, no meio de cultivo (HAJJAJ et al., 2000).

2.5 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Monascus* spp.

Monascus spp., bem como outros fungos filamentosos, utilizam, preferencialmente, carboidratos como fonte de carbono e energia e produzem compostos como etanol e enzimas e metabólitos secundários pela via policetílica (JUZLOVA et al., 1996).

Os metabólitos secundários são compostos que não estão envolvidos nas vias bioquímicas essenciais para o crescimento e a reprodução dos organismos, ao contrário dos metabólitos primários. São representados por processos como síntese de proteínas, biossíntese de ácidos graxos e policetídeos. Os metabólitos secundários são sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária e são frequentemente bioativos. São normalmente derivados do substrato utilizado e são formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumulados (HAJJAJ et al., 1999).

Os pigmentos de *Monascus* são tradicionalmente produzidos por processos biotecnológicos em estado sólido, como pedaços de pão ou arroz. Estudos envolvendo cultivos submersos têm aumentado devido a vantagens como: minimizar os problemas de espaço, de escala e de controle de processos (HAJJAJ et al., 2000). Os cultivos em estado sólido requerem sistemas de controle complexos, enquanto que em culturas em estado líquido, o controle do cultivo é mais simples, o tempo de cultivo e o custo da produção podem ser reduzidos e a produção de metabólitos secundários pode ser beneficiada (DOMINGUEZ-ESPINOSA e WEBB, 2003).

Os principais fatores que influenciam o crescimento e a produção de pigmentos por *Monascus* são: composição do meio de cultivo, temperatura, presença de oxigênio e aeração (PASTRANA et al., 1995; HAMDI et al., 1996; VENDRUSCOLO, 2009), pH inicial do meio de cultivo (YONGSMITH et al., 1993; BABITHA et al., 2006, MUKHERJEE e SINGH., 2011) fonte de nitrogênio (PASTRANA et al., 1995; JUNG et al.; 2003; MUKHERJEE e SINGH., 2011), reologia do meio de cultivo (AHN et al., 2006; VENDRUSCOLO et al., 2010) e morfologia do microrganismo (CARELS e SHEPHERD, 1975).

A faixa de temperatura ótima para o crescimento de *Monascus* depende da cepa e varia de 28 °C a 32 °C. O crescimento e a produção de pigmentos são observados em uma ampla faixa de pH, de 2,5 a 8,0, com a faixa ideal entre 4,0 e 7,0 (CARVALHO et al., 2005). Variações no pH do meio de cultivo do gênero *Monascus* spp., alteram a proporção entre os diversos pigmentos produzidos e também a sua liberação no

meio (principalmente dos pigmentos vermelhos) (MUKHERJEE e SINGH, 2011). A adição de uma fonte de nitrogênio apropriada no meio de cultivo, como os aminoácidos, facilita a liberação e a solubilização desses pigmentos (PASTRANA et al., 1995). A produção de pigmentos pode ser controlada pela limitação do substrato e a composição dos pigmentos depende dos nutrientes disponíveis, como fonte de nitrogênio e uso de cepas específicas (MIYAKE et al., 2008).

A produção de pigmentos está relacionada com a formação de estruturas de reprodução sexuada (cleistotécios). O acompanhamento microscópico destas estruturas aliadas ao controle dos fatores de cultivo pode ser utilizado como uma ferramenta de controle e também para redução de custos nas etapas do processo (MORITZ, 2005).

A morfologia das células de *Monascus*, durante o cultivo, tem efeito no rendimento final de pigmentos. A morfologia do micélio pode ser controlada pela agitação, sendo que as células com micélio curto são melhores para a produção de pigmentos devido à menor viscosidade do meio (KIM et al., 2002). A morfologia dos micélios de fungos filamentosos muitas vezes aumenta a viscosidade do meio de cultivo, que pode resultar num certo número de problemas (mistura fraca, transferência de oxigênio insuficiente e formação de zonas de concentração de nutrientes), o que afeta diretamente a produtividade, como a formação de pigmentos por *Monascus* spp. (AHN et al, 2006).

Agitação e aeração são parâmetros de grande influência no crescimento e na produção de metabólitos secundários por *Monascus ruber*. Em condições de alta concentração de oxigênio, a produção de citrinina é favorecida, e uma relação linear foi observada entre o rendimento de citrinina e a concentração de oxigênio (HAJJAJ et al., 1999). De acordo com Hajjaj et al. (2000), a síntese de pigmentos aumenta com o aumento da concentração de oxigênio em um perfil parabólico, ilustrando que a produção de pigmentos é inibida em culturas em condições anaeróbias.

A imobilização do fungo também tem potencial para aumentar a produtividade de pigmentos quando usado um sistema de aeração adequado e pode facilitar a separação do pigmento do meio de cultivo (EVANS e WANG, 1984; DOMINGUEZ-ESPINOSA e WEBB, 2003).

Liu et al. (2010) sugere a encapsulação das células de *Monascus* para aumentar a produtividade de pigmentos em cultivo submerso, proporcionando um suporte para o micélio e HU, Z. et al. (2012) estudaram a produção de pigmentos intracelulares e extracelulares em cultivo contendo solução aquosa de surfactante, obtendo uma concentração elevada de pigmentos e alta densidade de células.

O cultivo tradicional de *Monascus* spp. visando à produção de pigmentos naturais utilizados em alimentos é realizado em meio semi-sólido, tendo arroz como substrato principal. Entretanto, fontes de carbono diversas vêm sendo usadas como substrato para o crescimento de *Monascus*, sendo as mais comuns: glicose, sacarose e amido. O melhor crescimento geralmente é observado em glicose (HAJJAJ et al., 2000). O Quadro 2.4 apresenta alguns substratos alternativos para a produção de pigmentos por *Monascus* spp.

QUADRO 2.4 – Substratos utilizados para a produção de pigmentos de *Monascus* através de processos biotecnológicos.

Substrato	Microrganismo	Referência
Suco de pêra	<i>Monascus purpureus</i> CBS 10907	HAMDI et al. (1996)
Etanol	<i>Monascus purpureus</i> CBS 10907	HAMDI et al., (1997)
Frutose, maltose, sucrose e lactose	<i>Monascus purpureus</i>	TSENG et al. (2000)
Farinha de trigo	<i>Monascus purpureus</i> Went (IMI 210765)	DOMINGUEZ- ESPINOSA e WEBB (2003)
Farelo de arroz	<i>Monascus ruber</i> CCT 3802	MORITZ (2005)
Sementes de frutas	<i>Monascus purpureus</i> LPB 97	BABITHA et al., (2006)
Melaço de milho	<i>Monascus ruber</i>	HAMANO e KILIKIAN, (2006)
Bagaço de uva	<i>Monascus purpureus</i> NRRL1992	SILVEIRA et al. (2008)
Farinha de milho	<i>Monascus purpureus</i> M3428	XU (2011)
Amido de mandioca	<i>Monascus purpureus</i> TISTR 3002, 3180, 3090 e 3385	KONGRUANG (2011)
Glicerol	<i>Monascus ruber</i> CCT 3802	MEINICKE et al. (2012)

O custo do meio de cultivo para a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus* spp. é uma fração significativa do custo total do processo devido ao baixo custo do produto e à necessidade de

purificação. O meio de menor custo encontrado por Hamano e Kilikian (2006) foi composto de 10 g/L de glicose, 5 g/L de melação de milho e 7,6 g/L de glutamato monossódico com produção de 20,7 UA de pigmento vermelho e produtividade de 0,35 UA/h em frascos de Erlenmeyer de 500 mL.

Em cultivos de *Monascus purpureus* em frascos de 250 mL, contendo glicose como fonte de substrato, Lee et al. (2001) obtiveram produção de 11 UA de pigmento vermelho e aproximadamente 5 g/L de biomassa. Não observaram produção de pigmentos em cultivos contendo lactose e sucrose como fonte de carbono e em ensaios com os substratos maltose, frutose, etanol e amido solúvel houve crescimento, com produção de pigmentos, porém, menores do que os observados utilizando glicose como fonte de carbono.

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 9,0 UA de pigmento vermelho.

A glicose quando consumida por *Monascus* é primeiro metabolizada a acetil CoA, que integra a via dos ácidos tricarbóxicos (TCA) e está relacionada com a produção de pigmentos quando se associa ao Malonil CoA para iniciar o ciclo dos tetracetídeos e síntese dos pigmentos. O ciclo de *Krebs*, tricarbóxico (TCA) ou do ácido cítrico, é uma rota que possui reações catabólicas e anabólicas com a finalidade de oxidar o acetil-CoA, obtido pela degradação de carboidratos. Este ciclo inicia-se quando o piruvato que é sintetizado durante a glicólise é transformado em acetil CoA por ação da enzima piruvato desidrogenase. Este composto reage com o oxaloacetato, que é um produto anterior, formando-se citrato. O citrato então passa por uma série de transformações químicas para a formação de substâncias orgânicas.

A glicólise consiste numa série de reações químicas catalisadas por enzimas, nas quais uma molécula de glicose vai ser degradada em duas moléculas de piruvato. Durante a sequência de reações, uma parte da energia livre proveniente da degradação da glicose vai ser conservada em ATP e NADH. Este processo é o caminho central no catabolismo da glicose e é de uma importância vital para inúmeros organismos, alguns dos quais têm neste processo a sua única fonte de energia metabólica. Todos os seres vivos realizam a glicólise em condições de aerobiose ou anaerobiose com as enzimas glicolíticas presentes no citoplasma. Em condições de aerobiose, o piruvato formado na glicólise é oxidado pelo complexo enzimático piruvato-desidrogenase, havendo a formação de

acetil-CoA e a liberação de uma molécula de CO_2 para cada piruvato oxidado (LEHNINGER et al., 2000). A Figura 2.5 apresenta a rota da glicólise em fungos filamentosos.

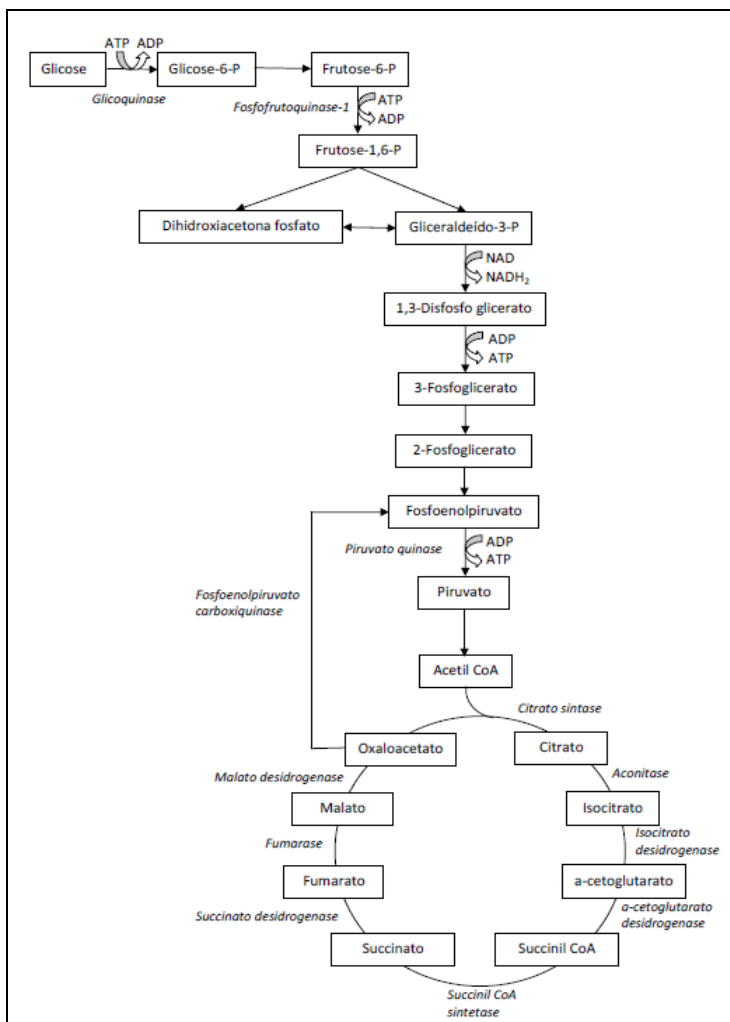


FIGURA 2.5 – Glicólise em fungos filamentosos (Adaptado de CHAMBERGO ALCALDE, 2002).

De acordo com Babitha et al. (2008), estudos dos fatores que afetam o crescimento e o metabolismo dos fungos filamentosos são

necessários, pois contribuem para controlar o metabolismo celular e otimizar a biossíntese de certos produtos, como os pigmentos de *Monascus*.

2.6 INFLUÊNCIA DA LUZ NA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS

A luz, assim como a temperatura, é um fator importante para a regulação do desenvolvimento e dos processos fisiológicos na maioria dos organismos. No reino dos fungos, a luz pode regular o crescimento, a direção desse crescimento, a reprodução sexuada ou assexuada e a formação de pigmentos, que são aspectos muito importantes para a sobrevivência e a disseminação de espécies de fungos (MIYAKE et al., 2005).

Análises de genomas de fungos identificaram vários genes que codificam proteínas envolvidas na detecção de luz e ativação dos mecanismos de respostas fisiológicas e morfológicas (CARROCHANO et al., 1995). As respostas à luz são mediadas por fotorreceptores capazes de iniciar a transmissão de sinais, que resultam em alterações na expressão de genes que codificam as enzimas responsáveis pelo crescimento micelial e a produção de metabólitos secundários em fungos (ZHENG et al., 2009; VELMURUGAN et al., 2010).

Os fotorreceptores possuem estruturas simples que mediam o desenvolvimento e outras respostas nos organismos. O cromóforo, molécula sensível à luz, comunica fisicamente o impacto da luz para o resto da célula ou organismo. Em animais, os fotorreceptores incluem as opsinas e criptocromos. No reino vegetal, os fotorreceptores, incluindo criptocromos e fotopropinas interagem com a flavina na resposta à luz. Os fitocromos nas plantas são vinculados a uma molécula de tetrapirrol e são sensíveis à luz vermelha para controlar o relógio circadiano. Leveduras e bactérias também contêm fitocromos. Os fungos são ideais para estudar o efeito da luz, pois são haplóides, podendo uma simples mutação resultar em um fenótipo e são sensíveis a vários comprimentos de onda no espectro visível (luz). O sequenciamento do genoma e as evidências fisiológicas revelaram que quatro classes de fotorreceptores encontrados em outros reinos estão presentes nos fungos (IDNURM e HEITMAN, 2005).

Os fungos respondem a comprimentos de onda do espectro visível: luz vermelha é captada pelo fitocromo HK (histidina quinase) e RR (regulador de resposta), luz verde por opsina e luz azul por *white collar 1* e VIVID, e possivelmente, criptocromos (Figura 2.6). Os fungos ascomicetos *Neurospora crassa* e *Trichoderma atroviride*

apresentam funções com resposta a luz nas cores vermelho, azul e verde (IDNURM e HEITMAN, 2005).

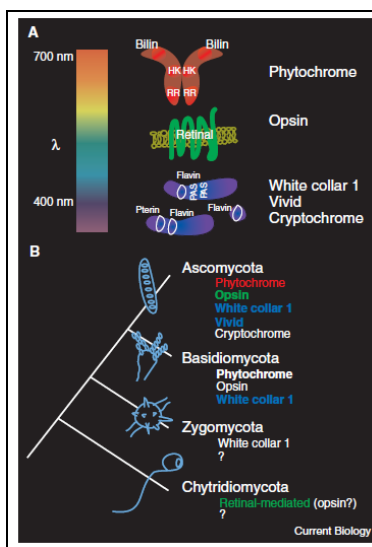


FIGURA 2.6 – Proteínas fotorreceptoras em fungos (Fonte: IDNURM e HEITMAN, 2005).

Miyake et al. (2005) observaram que o gênero *Monascus* responde à fonte de iluminação (vermelha e/ou azul) regulando a produção de metabólitos secundários e o desenvolvimento de células, sendo um fator que deve ser considerado. Os autores estudaram o efeito da luz (vermelha ou azul) e ausência de luz no desenvolvimento de micélio e de esporos de *Monascus pilosus* em placas contendo meio BDA e em cultivo líquido. Verificaram a formação de colônias nas placas com BDA incubadas a 30 °C. O tamanho das colônias não variou nas condições estudadas e após 10 dias de cultivo, as cadeias de conídios observadas no micélio na ponta das colônias expostas à luz vermelha foram menores e o crescimento foi menor comparado às colônias que cresceram na ausência de luz. As cadeias de conídios no micélio formado nas colônias expostas à luz azul foram mais longas e o crescimento foi mais lento em relação às colônias que cresceram na ausência de luz. A formação de esporos foi estimulada pela exposição à luz. O número de ascocarpos foi maior em luz vermelha, mas não em azul, e a germinação de conídios foi estimulada em luz azul e não em luz vermelha. A menor formação de conídios e esporos foi observada

nas colônias que se desenvolveram na ausência de luz. Essas observações indicaram que o fungo tem sensibilidade para diferenciar as condições de luz (vermelha e azul) e ausência de luz, respondendo com diferentes desenvolvimentos de micélio e formação de esporos.

Para Babitha et al. (2008), a incubação no escuro de *Monascus purpureus* em frascos aletados de 250 ml resultou num aumento na produção de pigmentos (aproximadamente 2 vezes) e o crescimento do fungo em iluminação direta e contínua resultou na redução da produtividade de formação de pigmentos. A produção de pigmentos no meio de cultivo aumentou com a exposição à luz vermelha, enquanto que os comprimentos de onda verde e azul inibiram a produção de pigmentos.

Velmurugan et al. (2010) verificaram que há alterações na composição dos pigmentos, que dependem da condição da luz, em cultivos de *Monascus purpureus* em frascos cobertos com filme colorido contendo 100 ml de meio de cultivo composto de glicose e sais. Concluíram que o efeito da luz nos pigmentos intra e extracelulares e na produção de biomassa pelo fungo revelaram que a incubação na ausência da luz foi mais efetiva, seguida das luzes nas cores vermelha, azul e exposição direta. As luzes amarela e verde inibiram a produção de pigmentos e o crescimento.

A luz é um fator que influencia a produção de metabólitos secundários, como produção de toxinas pelo fungo *Alternaria alternata*. Häggblom e Niehaus (1987) e Häggblom e Niehaus (1986) verificaram que a produção de toxinas pode ser reduzida pela luz azul e a iluminação direta pode reduzir a biossíntese de policetídeos.

Zheng et al. (2009) estudaram a influência da luz na produção de biomassa e de compostos fenólicos antioxidantes em cultivos submersos de *Inonotus obliquus*, um fungo basidiomiceto usado para o tratamento de diversas doenças humanas e encontrado na Rússia e no Norte Europeu. Os ensaios foram realizados em frascos cobertos com filme colorido para avaliar a influência dos comprimentos de onda de 490 nm (luz azul), 650 nm (luz vermelha), ausência de luz (filme preto) e iluminação direta. Os frascos foram incubados em agitador orbital e expostos a iluminância de 6.000 lux (tubos fluorescentes) na condição de 12 h claro/12 h escuro. Observaram que a luz direta inibiu a biossíntese de vários polifenóis, enquanto que em ausência de luz (filme escuro) houve formação dos compostos fenólicos. Nos frascos com filme azul e filme vermelho verificaram produção dos compostos fenólicos em níveis mais baixos do que os frascos na ausência de luz. O potencial de atividade antioxidante dos compostos fenólicos obtidos nos

frascos com filme azul, filme vermelho e filme preto foi maior do que aqueles produzidos em frascos expostos à iluminação direta, demonstrando que a luz regula a biossíntese de polifenóis e sua atividade antioxidante em *I. obliquus*.

Quando exposto à luz vermelha (680 nm) e azul (450 nm) existe menor esporulação, com inibição do ciclo sexual. A luz vermelha estimula e a luz azul reprime o desenvolvimento sexual no fungo *Aspergillus nidulans* (IDNURM e HEITMAN, 2005).

Em cultivos submersos do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, Ramirez et al. (2010) verificaram a influência de vários comprimentos de onda no desenvolvimento e na produção de lignina peroxidase. A luz verde teve efeito positivo significativo na atividade da enzima lignina peroxidase e na produção de biomassa em comparação aos cultivos expostos à luz direta, luz amarela, luz azul, luz vermelha e ausência de luz.

Danesi et al. (2004) verificaram que a redução da intensidade luminosa de 5.000 lux para 2.000 lux aumentou a produção de clorofila total em cultivo submerso de *Spirulina platensis*. Contudo, o crescimento celular foi maior em intensidade luminosa de 5.000 lux, indicando que condições de limitação de luz influenciam no metabolismo de produção de pigmentos.

2.7 BIODIESEL

O biodiesel tem sido definido como a mistura de ésteres de cadeia longa de ácidos graxos derivados de óleos renováveis como óleo vegetal e gordura animal para uso em motores de ignição (SALEH et al., 2010).

Devido ao esgotamento das reservas de petróleo e o aumento da preocupação nas questões ambientais, existe uma demanda para fontes alternativas de combustíveis. Biodiesel é um combustível renovável, considerado recentemente o melhor substituto para o diesel derivado do petróleo devido à possibilidade de uso em muitos motores de ignição atualmente existentes (GOMES et al., 2011).

Existem quatro meios principais para a produção de biodiesel: uso direto e misturas, microemulsão, pirólise e transesterificação. O método mais usado é a transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais. A reação de transesterificação é afetada pelo rendimento de glicerídeos em álcool, catalisadores, temperatura e tempo de reação, conteúdo de ácidos graxos livres e conteúdo de água nos óleos e gorduras (MA e HANNA, 1999). A Figura 2.7 apresenta o esquema de reação global de formação de biodiesel.

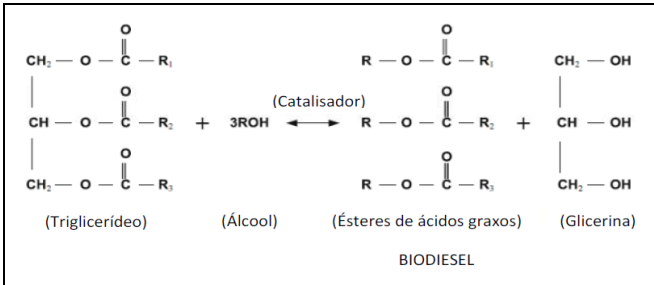


FIGURA 2.7 – Reação de produção de biodiesel.

O biodiesel é um combustível diesel de queima limpa com uma estrutura de ésteres metílicos. As reações de transesterificação requerem um álcool como reagente e um catalisador. O álcool mais utilizado é o metanol e como catalisadores são utilizados o hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio. Durante a reação, ocorre a produção de 10% do co-produto glicerol (LEUNG et al., 2010). A Figura 2.8 apresenta um fluxograma simplificado de processo de transesterificação com catalisador básico.

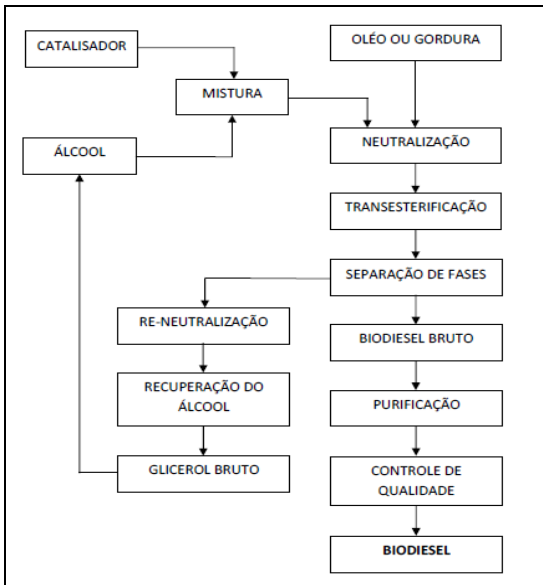


FIGURA 2.8 – Fluxograma simplificado do processo de produção de biodiesel por transesterificação utilizando catalisador (PARENTE, 2003).

O desenvolvimento de novos catalisadores para produção de biodiesel por transesterificação tem sido estudado. Observa-se o uso de diferentes catalisadores ácidos e básicos e mais recentemente a utilização de enzimas para aumentar o rendimento e diminuir o impacto ambiental na produção do biodiesel (PINTO et al., 2005).

Contudo, o custo do biodiesel pode ser um impedimento para a comercialização do produto. O uso de óleo de cozinha usado, processos de transesterificação contínua e recuperação do co-produto glicerol são opções para diminuir o seu custo (MA e HANNA, 1999).

2.8 PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL

A partir de janeiro de 2005 (Lei 11.097/05), as refinarias e distribuidoras foram autorizadas a adicionar 2% de biodiesel ao diesel (B2). Em 2008, esse percentual passou a ser obrigatório e devido à rápida resposta do lado da oferta, o governo transformou a mistura B5 obrigatória em 2010. Após a implementação do PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel), entre 2005 e 2011, houve um aumento significativo no volume de biodiesel produzido no país, que passou de 736 m³ em 2005 para 2,39 milhões m³ em 2010, fazendo do Brasil o segundo maior produtor de biodiesel no mundo. Em 2010, a mistura B5 já fazia parte do diesel consumido no Brasil, com 81% do biodiesel proveniente de óleo de soja e 14% de sebo bovino. Por outro lado, os planos para diversificar as matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel e melhorar a produção nas regiões mais pobres do Brasil não conseguiram prosperar (PADULA et al., 2012).

No Brasil existem atualmente 64 plantas produtoras de biodiesel autorizadas, correspondendo a uma capacidade total de 19.533,95 m³/dia. A principal matéria-prima utilizada é o óleo de soja, correspondendo a aproximadamente 78% da matéria-prima total. A gordura bovina corresponde a 15% e o óleo de algodão a 3,7%. São ainda utilizadas a gordura de frango, gordura suína e óleo de fritura (ANP, 2012).

No sul do Brasil, o biodiesel é produzido a partir de óleo de soja, porém, existem estudos para o uso de óleo de girassol e de canola, podendo o biodiesel puro (B100) ser usado em microtratores em fazendas familiares (PORTE et al., 2010).

O co-produto obtido do biodiesel é composto aproximadamente de 50% de glicerol, água, sais e álcool que não reagiram e catalisadores. Geralmente, água e álcool são removidos para produção de 80 - 88% de glicerol, que pode ser comercializado como glicerol bruto. O glicerol

também pode ser destilado por operações mais complexas para pureza de 99% ou maior e comercializado para vários mercados. Após a fase de neutralização, o álcool na fase do glicerol pode ser removido através de vácuo ou evaporadores e reutilizado no processo (LEUNG et al., 2010).

Uma preocupação é a gestão adequada dos subprodutos de biodiesel, devido à implementação deste combustível na matriz energética do Brasil. Em geral, 10 kg de glicerol são gerados como subproduto de cada 100 kg de biodiesel produzido. Cerca de 2,4 bilhões de litros de biodiesel foram produzidos para atender à exigência legal estabelecida de adição de 5% (percentagem obrigatória) ao óleo diesel fóssil, o que gerou aproximadamente 240 milhões de litros de glicerol (LEONETI et al., 2012).

Apesar de ser o biodiesel o principal produto desejado das reações, o refino do glicerol também é importante devido às suas numerosas aplicações em diferentes produtos industriais como hidratantes, sabão, cosméticos, medicamentos, entre outros. Pode ser utilizado como detergente para limpezas pesadas e fermentado para produção de etanol (LEUNG et al., 2010).

2.9 GLICEROL

O termo glicerol aplica-se ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais não purificados, normalmente contendo até 95% de glicerol. Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas. Conforme o grau de pureza ou teor de glicerol, a glicerina recebe os seguintes nomes: glicerina bruta ou crua; glicerina loira, comercial ou semi-refinada e glicerina refinada ou bi-destilada. Define-se glicerina como um co-produto direto do biodiesel e é composto de uma mistura de glicerol, álcool, sais, água, mono, di ou triglicerídeos, ácidos graxos, ésteres e Matéria Orgânica Não-Glicerol (MONG) (MOTA et al., 2009).

A glicerina bruta não sofre tratamento de purificação e geralmente contém entre 40% e 80% de glicerol. A sua composição varia dependendo da matéria-prima original e do processo de produção de biodiesel. A glicerina bruta é composta basicamente por 8 componentes: glicerol, metanol, água, sabão, glicerídeos, ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e cinzas (THOMPSON e HE, 2006).

Para Hu S. et al. (2012), 85% da massa total de glicerina bruta obtida da produção de biodiesel foi composta de glicerol, metanol, ésteres, sabão e água. O total de glicerídeos, ácidos graxos livres e cinzas foi menor do que 15% da massa total. A concentração de glicerol variou de 22,9% a 63,0%, sendo necessária a caracterização da composição da glicerina bruta antes do uso em processos de conversão.

A glicerina loira, comercial ou semi-refinada, é produzida a partir da glicerina bruta. Esta glicerina é geralmente submetida a um processo de evaporação *flash*, filtração e adição de alguns químicos, resultando na remoção parcial do álcool e outras substâncias, obtendo desta forma glicerina sempre líquida e com teor de glicerol entre 80% e 90% (THOMPSON e HE, 2006).

A Tabela 2.2 apresenta valores encontrados na literatura para propriedades físico-químicas de glicerina bruta e glicerina loira obtidas da produção de biodiesel.

TABELA 2.2 – Valores encontrados na literatura para propriedades físico-químicas de glicerina obtida do processo de produção de biodiesel.

	pH	Densidade (kg/m ³)	Umidade	Teor de glicerol	Cinzas
Glicerina bruta de óleo de algodão (FERREIRA, 2009)	11,48	1.080,0	20,65%	-	-
Glicerina bruta de óleo de soja (GUERRA, 2010)	5,33	-	9,22%	86,95%	3,19%
Glicerina bruta de óleo de soja (HU, S., 2012)	6,9	1.200,0	28,7%	63%	2,7%
Glicerina bruta de sebo bovino (MATURANA, 2011)	7,9	1.061,0	1,5%	48,5%	4,0%
Glicerina loira (MATURANA, 2011).	-	1.290,0	7,0%	80%	10%

A glicerina destilada ou bi-destilada é um produto límpido e transparente, obtido através da purificação, geralmente realizada por destilação sob pressão reduzida, da glicerina bruta (JAVANI et al., 2012).

As glicerinas refinadas são classificadas de acordo com a porcentagem de glicerina em: grau técnico (99,5%), bi-destilada (99,5%), base vegetal (96% USP), base sebo ou gordura animal (99,5% USP), base vegetal (99,5% USP), USP/FCC – *kosher* (99,5%) e USP/FCC – *kosher* (99,7%). As glicerinas USP (United States Pharmacopeia) são aquelas que cumprem os requisitos para serem utilizadas em alimentos e medicamentos e as FCC (Food Chemical Codex) para alimentos. A *kosher*, glicerina de origem vegetal, é a que reúne as exigências para uso em alimentos da comunidade judaica (SINGHABHANDHU e TEZUKA, 2010).

A glicerina purificada (grau USP ou glicerina farmacêutica) tem grande aplicação nos setores de cosméticos, higiene pessoal, alimentos, medicamentos e fumo. Em termos de transformação química ela ainda apresenta aplicações limitadas, sendo as principais na produção de explosivos, como a nitroglicerina, e na formação de resinas alquídicas. Estimou-se que em todo o mundo a produção de glicerol alcançaria 1,2 milhões de toneladas em 2012, devido ao aumento da produção de biodiesel (MOTA et al., 2009). A Figura 2.09 apresenta algumas aplicações do glicerol.

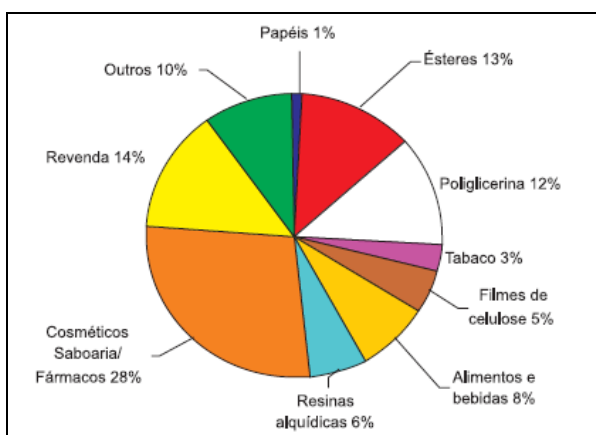


FIGURA 2.9 – Aplicações do glicerol (Fonte: MOTA et al., 2009).

A rentabilidade de vários processos químicos depende também da comercialização dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e do preço final do produto. Dessa forma, existe um grande interesse na purificação da glicerina ou seu reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporciona a viabilização do processo de produção do biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no mercado de biocombustíveis (RIVALDI et al., 2007).

A União Europeia tem promovido o uso do biodiesel, porém, uma grande quantidade de glicerina é gerada como co-produto, e o mercado está saturado, sendo necessário o estudo de aplicações para essa glicerina (GALAN et al., 2009).

Algumas empresas europeias apresentam problemas relacionados ao excesso de glicerol produzido, tendo que pagar para que seja feita uma disposição adequada do mesmo. O aumento significativo na produção de glicerol tem levado à queda dos preços, sendo inclusive responsável pelo fechamento de muitas das fábricas que produziam glicerol por via química (DHARMADI et al., 2006; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

O glicerol pode ser produzido por fermentação microbiana, sintetizado quimicamente ou recuperado como principal co-produto de reações de saponificação, como a produção de biodiesel. A glicerina bruta derivado da produção de biodiesel pode ser facilmente concentrada, porém, a purificação industrial apresenta altos custos e desvantagens ecológicas (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

2.10 PURIFICAÇÃO DA GLICERINA

O glicerol é uma matéria prima importante para a indústria alimentar, farmacêutica e fabricação de cosméticos. No entanto, devido à presença de grande quantidade de impurezas, a glicerina bruta não pode ser diretamente utilizada na indústria alimentar ou farmacêutica, podendo ser purificada, sendo o seu processo de purificação caro (AMARAL et al., 2009).

Os processos para purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para remoção dos catalisadores (ISAHAK et al., 2010).

Os processos tradicionais de purificação da glicerina bruta aplicados na indústria consideram duas rotas: a. Rota 1 (Acidificação, neutralização, evaporação e refino da glicerina por destilação); b. Rota 2 (Acidificação, neutralização, diluição, troca iônica e evaporação). Ambos os processos envolvem operações unitárias (evaporação e

destilação) com grande consumo energético, perdas de tempo e de glicerina, tempo gasto na limpeza dos equipamentos (1/3 do tempo total de operação) e bom controle da condensação fracionada (BOURNAY et al, 2005).

A evaporação é uma das operações de maior consumo energético, geralmente efetuada em evaporadores de múltiplos efeitos, utilizando baixas pressões. Durante a evaporação da água concentram-se o glicerol e o sal, que cristaliza, sendo necessária a sua retirada contínua. O sal residual dissolvido na glicerina concentrada pode ser sedimentado em tanques cônicos para separação. A glicerina obtida nessa etapa é chamada de glicerina de grau técnico. Para a obtenção da glicerina com grau de pureza maior de 99%, ocorre o refino através de destilação (JAVANI et al., 2012).

A glicerina pode ser destilada sob alto vácuo. Vapor é injetado durante a destilação para que a temperatura permaneça abaixo de 200 °C, evitando a polimerização ou decomposição da glicerina. Uma condensação controlada do vapor separa a glicerina do vapor d'água e a glicerina condensada, com até 99% de pureza sofre desodorização por sopro de vapor em alto vácuo e é clareada utilizando carvão ativado. (PARENTE, 2003).

2.11 CONVERSÃO BIOTECNOLÓGICA DA GLICERINA OBTIDA DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL

O investimento em pesquisas para novas aplicações da glicerina se faz necessário antes que maiores problemas ambientais ocorreram com o aumento na produção do biodiesel. Alguns produtos químicos atualmente obtidos através do petróleo poderiam ser produzidos por processos biotecnológicos utilizando a glicerina, beneficiando diretamente o meio ambiente ao mesmo tempo em que promove a inclusão social. A bioconversão da glicerina permitiria a obtenção de produtos biodegradáveis, contribuiria para reduzir a dependência pelo petróleo com a grande vantagem de utilizar uma fonte renovável. O desenvolvimento de processos para converter o glicerol, um composto de baixo preço, em produtos de alto valor, pode agregar valor ao biodiesel, contribuindo para o desenvolvimento das biorefinarias (DHARMADI et al., 2006; YAZDANI e GONZALEZ, 2007).

O excesso de glicerol gerado pela produção de biodiesel pode tornar-se um problema ambiental, uma vez que não pode ser eliminado no meio ambiente. Uma das possíveis aplicações é a sua utilização como

fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano em processos biotecnológicos (AMARAL et al., 2009; SILVA et al., 2009).

Devido ao baixo custo e grande aplicabilidade, tem aumentado o estudo da valorização do glicerol através de processos de fermentação microbiana para obtenção de produtos de alto valor agregado como proteínas recombinantes, enzimas, drogas medicinais e química fina. A valorização biotecnológica mais conhecida é a conversão do glicerol em 1,3 – propanodiol. A glicerina bruta também tem sido empregada como substrato para a produção de metabólitos, como ácidos orgânicos, polióis, lipídeos microbianos, células e biomassa em cultivos por leveduras, fungos e algas (CHATZIFRAGKOU et al., 2011). O Quadro 2.5 apresenta alguns microrganismos capazes de produzir metabólitos de interesse utilizando glicerina bruta como substrato em processos biotecnológicos.

Alguns estudos têm sido realizados utilizando glicerol como fonte de carbono para produção de pigmentos, tais como prodigiosina, astaxantina e carotenoides. Prodigiosina é um pigmento vermelho formado pela bactéria gram-negativa *Serratia marcescens*. Tao et al. (2005) demonstraram que o glicerol permitiu a produção de prodigiosina quando utilizado como principal fonte de carbono. Kusdiyantini et al. (1998) demonstraram que o glicerol é um substrato potencial para a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* e Cardoso (2008) estudou a produção de β -caroteno e torularodina através de *Sporobolomyces ruberrimus* usando glicerina bruta como substrato.

Cardoso (2008) observou que co-produtos industriais, como a glicerina obtida da produção de biodiesel, apresentam variação na composição. A composição pode influenciar no metabolismo de microrganismos, sendo importante a caracterização das amostras. O microrganismo *Sporobolomyces ruberrimus* foi cultivado utilizando glicerina como substrato para produção de carotenoides e sofreu influência da composição de ácidos graxos das amostras para a produção dos pigmentos.

Sarma et al. (2012) sugere que a glicerina bruta deve ser pré-tratada antes de ser utilizada como matéria-prima em processos biotecnológicos, pois além de glicerol, o biodiesel típico pode conter elevadas concentrações de sais (por exemplo, cloreto de sódio), metanol e sólidos precipitados, o que pode afetar o crescimento microbiano. Contudo, verifica-se em outros estudos, que a glicerina bruta pode favorecer a produção dos metabólitos devido à presença dos nutrientes (LIU et al., 2011).

QUADRO 2.5 – Metabólitos produzidos por microrganismos utilizando glicerina bruta como substrato.

Microrganismo	Metabólitos	Referências
<i>Clostridium butyricum</i>	1,3 - propanodiol	BARBIRATO et al., (1998) PAPANIKOLAOU et al., (2003)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ácido cítrico	PAPANIKOLAOU et al., (2002) IMANDI et al., (2007)
<i>Schizochytrium limacinum</i>	Ácidos graxos	CHI et al., (2007) ETHIER et al., (2011)
<i>Pichia pastoris</i>	Enzima fitase	TANG et al., (2009)
<i>Lentinula edodes</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Ácido oxálico	ANDRÉ et al., (2010)
<i>Ustilago maydis</i>	Biosurfactantes	LIU et al., (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Carotenóides	SAENGE et al., (2011)
<i>Trichosporonoides spathulata</i> e <i>Kodamaea ohmeri</i>	Lípídeos microbianos	KITCHA e CHEIRSILP (2011)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Treonina	NITAYAVARDHANA e KHANAL (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lípídeos microbianos	YEN et al., (2012)
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Etanol	LIU et al., (2012)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Vitamina B12	KÓSMIDER et al., (2012)

O microrganismo *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir compostos interessantes como biosurfactantes e ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido pirúvico) a partir de glicerina bruta. Essa capacidade da *Yarrowia lipolytica* de utilizar substratos hidrofóbicos está relacionada à sua superfície com elevada hidrofobicidade (AMARAL et al., 2009).

Outra alternativa é a utilização do glicerol como substrato para o crescimento de leveduras oleaginosas como *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp. e *Lipomyces* sp. que podem acumular lípídeos intracelulares em até 70 % de seu peso de biomassa seca. As leveduras oleaginosas têm a capacidade de crescer e acumular lípídeos quando

cultivas em glicerol, têm tempos de geração curtos e não necessitam de muitos nutrientes. A glicerina bruta obtida da produção de biodiesel contém elementos como cálcio, potássio, magnésio, sódio e enxofre. Essa glicerina bruta pode então ser utilizada pelas leveduras para produzir óleo, que pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel, compensando os custos de produção do biocombustível (KITCHA e CHEIRSILP, 2011).

O processo e o tipo de biorreator podem influenciar na bioconversão da glicerina bruta. Tang et al. (2009) estudaram a produção da enzima fitase pelo microrganismo *Pichia pastoris* utilizando glicerina bruta como substrato e observaram que existe diferença nos resultados de produção em ensaios realizados em frascos agitados, biorreator batelada e batelada alimentada. A glicerina foi centrifugada, sendo observada influência da concentração inicial de glicerol no meio de cultivo, que inibiu a produção das enzimas em ensaios em biorreator batelada. A produção e o crescimento do microrganismo foram favorecidos em ensaios realizados em biorreator batelada alimentada, com oxigênio dissolvido no meio de cultivo.

A engenharia genética também tem sido utilizada para a modificação de microrganismos capazes de utilizar glicerina bruta como substrato, aumentando a produção dos metabólitos de interesse. Existem estudos como o desenvolvimento de cepas de *E. coli* recombinante para a produção de etanol e hidrogênio através da bioconversão da glicerina obtida da produção do biodiesel (SARMA et al., 2012).

O glicerol industrial ou sintético é utilizado a mais tempo em processos biotecnológicos. São exemplos: a produção de manitol por *Candida magnoliae* (KHAN et al., 2009), β -caroteno por algas *Dunaliella* spp. (SINGH e PHADWAL, 2003), proteínas e biomassa por *Pichia* spp. (D'ANJOU e DAUGULIS, 2000), 1-3-propanodiol (PAPANIKOLAOU et al., 2000) e β -caroteno e biomassa por *Rhodotorula lactosa* (MARTELLI et al., 1992) e *Rhodotorula glutinis* (EASTERLING et al., 2009).

O glicerol é uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável pelas bactérias e leveduras sob condições anaeróbias e aeróbias para produção de energia metabólica e compostos intermediários (RIVALDI et al., 2007). Nos fungos, o glicerol pode ser transportado através da membrana celular para o seu metabolismo. O transporte passivo do glicerol pode ser realizado através da difusão simples e da difusão facilitada mediada por proteínas localizadas na membrana plasmática (MOAT et al., 2002).

Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática, ele pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas. Uma das rotas consiste na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase para formar glicerol-3-fosfato, que é reduzido a dihidroxiacetona fosfato pela enzima glicerol fosfo-ubiquinona oxidoreductase. Essas enzimas são reprimidas durante o crescimento celular em substratos como glicose, mas ativas quando glicerol ou etanol são utilizados como principais fontes de carbono (GRAUSLUND et al., 1999).

Outra possível rota corresponde à oxidação de glicerol e consequente formação de dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase, que é fosforilada a dihidroxiacetona fosfato. A dihidroxiacetona fosfato é considerada uma importante molécula intermediária para a gliconeogênese e obtenção de outros compostos de interesse comercial como etanol, ácido cítrico e ácido acético (MOAT et al., 2002).

O glicerol pode ser convertido em glicerol-3-P (quinase do glicerol) que pode ser oxidado a di-hidroxiacetona-P, um intermediário da gliconeogênese (LEHNINGER et al., 2000). A Figura 2.10 apresenta algumas vias metabólicas de assimilação do glicerol por microrganismos através da gliconeogênese.

A gliconeogênese é o conjunto de processos metabólicos que permitem a formação de glicose (ou glicogênio) a partir de substratos não glicídicos, estando presente em plantas, animais, fungos e outros microrganismos. São importantes substratos da gliconeogênese o lactato, os aminoácidos ditos glicogênicos (como a alanina e o glutamato) e o glicerol.

O glicerol, através de duas rotas metabólicas, produz o dihidroxiacetona-fosfato, precursor do piruvato (SUN et al., 2010), importante na síntese de pigmentos por *Monascus*.

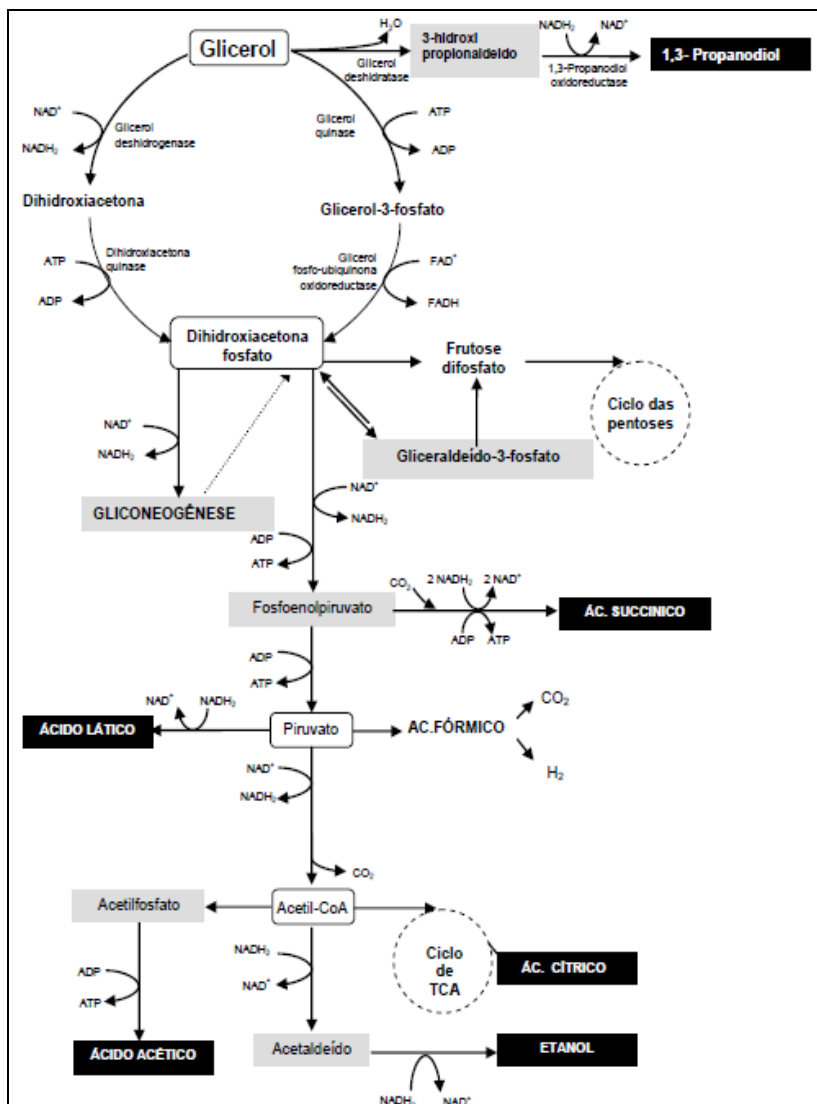


FIGURA 2.10 – Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos (Fonte: RIVALDI et al., 2007).

2.12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a revisão bibliográfica apresentada, existe um aumento do uso da glicerina bruta derivada do biodiesel em processos biotecnológicos para viabilizar a produção desse biocombustível. Por ser o Brasil um dos maiores produtores de biodiesel mundialmente, observa-se o aumento no uso do biocombustível e, conseqüentemente, um aumento na produção do co-produto glicerina.

Com a crescente restrição do uso de pigmentos sintéticos na indústria de alimentos e a preocupação com a saúde dos consumidores, o uso de pigmentos naturais é uma alternativa promissora. O *Monascus ruber* é uma fonte biotecnológica de corantes utilizados em alimentos. Os pigmentos *monascus* podem ser produzidos em cultivo sólido e em cultivo submerso utilizando principalmente glicose como substrato e o uso de resíduos pode diminuir o custo da produção desse corante.

Para viabilizar técnica e economicamente a produção dos pigmentos por *Monascus ruber* é importante o estudo dos fatores que afetam o cultivo e a separação dos pigmentos. Os fatores relatados na literatura que influenciam na produtividade de formação de pigmentos são substrato, pH, temperatura, aeração, intensidade luminosa e fonte de nitrogênio.

Contudo, verifica-se que o fator influência luminosa não é muito estudado, podendo ser aplicado para compreender o metabolismo do microrganismo e aumentar a produção de pigmentos. Também não existem estudos na produção de pigmentos *monascus* utilizando glicerina bruta, sem tratamento prévio, derivada da produção do biodiesel.

Nesse contexto, e de acordo com o apresentado na revisão bibliográfica, o desenvolvimento do presente trabalho é de extrema importância para a produção de pigmentos por *Monascus ruber* utilizando glicerina derivada da produção do biodiesel. O estudo da produção desses pigmentos em placas e cultivo submerso em frascos e biorreator, pela obtenção dos parâmetros cinéticos e verificação da influência dos fatores no cultivo, pode valorizar o co-produto do biodiesel a partir da obtenção de moléculas de maior valor agregado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – UFSC, com apoio financeiro do CNPq pelo processo 475935/2010-1 (Edital MCT/CNPq 14/2010).

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosso *Monascus ruber* CCT 3802, obtido da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello. O *Monascus ruber* foi mantido em meio BDA (Batata Dextrose Agar) e a manutenção da linhagem foi realizada em tubos de ensaio contendo ágar inclinado a 30 °C por 7 dias e posteriormente mantidos a 4 °C.

3.2 SUBSTRATO

Glicerinas provenientes de usinas brasileiras produtoras de biodiesel, obtido de óleo de soja, foram utilizadas como substrato para a produção de pigmentos por *Monascus ruber*. Foram avaliadas: glicerina-bruta sem tratamento prévio (BSBIOS – Passo Fundo/RS) e glicerina loira e glicerina bi-distilada (ABOISSA Óleos Vegetais – São Paulo/SP), conforme Figura 3.1. Para comparação foram realizados ensaios utilizando glicerol P.A. e glicose como substratos.



FIGURA 3.1 – Aspecto visual dos substratos. Da esquerda para a direita: glicerina bruta, glicerina loira, glicerina bi-distilada e glicerol P.A.

Para caracterização das amostras foram realizadas as análises físico-químicas: umidade, cinzas, teor de glicerol, pH, densidade e perfil de ácidos graxos.

O teor de glicerol foi determinado por método espectrofotométrico descrito por Lambert e Neish (1950) após reação com ácido periódico. Nesta reação, o glicerol é oxidado quantitativamente a formaldeído, determinado em comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro SP-1100 SÉRIES MODELO SP-105.

A umidade foi determinada pelo método baseado em Bruttel e Schlink (2006) e Zenebon e Pascuet (2005). O teor de cinzas foi determinado pelo método proposto por Zenebon e Pascuet (2005) e a densidade foi obtida em picnômetro de 25 mL. Essas análises físico-químicas foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas/SP).

Para a caracterização do perfil de ácidos graxos, as amostras foram submetidas à análise físico-química de lipídeos totais pelo método proposto por Zenebon e Pascuet (2005), e também foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas/SP).

3.3 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM PLACAS

3.3.1 Determinação da velocidade de crescimento radial

Foram realizados ensaios em meios de cultura sólidos em placas de Petri, a fim de avaliar a velocidade de crescimento radial de *Monascus ruber*. O inóculo foi preparado transferindo duas alçadas do microrganismo para tubos *ependorf* contendo 2,0 mL de ágar 0,2%. Com auxílio de uma ponteira estéril, com diâmetro de 1,0 mm, a suspensão de esporos foi inoculada no centro de cada placa. Foram traçadas três raias no fundo das placas para medição do raio de cada colônia, garantindo, assim, que as culturas que não apresentassem um crescimento regular tivessem calculado seus raios médios (GABIATTI JUNIOR et al., 2004).

Obteve-se a velocidade de crescimento radial das colônias pela regressão linear da média dos raios em função do tempo (Equação 3.1).

$$r(t) = V_{CR} \cdot t + 0,5 \quad (3.1)$$

V_{CR} : velocidade de crescimento radial ($\text{mm} \cdot \text{h}^{-1}$)

t: tempo (h)

r: raio (mm)

Considerou-se o valor 0,5 mm como coeficiente linear da equação, visto que esse é o raio inicial do inóculo.

Os ensaios foram realizados em meio BDA e em meio solidificado contendo substrato nas concentrações apresentadas na Tabela 3.1; 5,0 g/L de glicina; 20,0 g/L de ágar bacteriológico e sais na concentração proposta por Pastrana et al. (1995) e Hajjaj et al. (1999): 5,0 g/L de KH_2PO_4 ; 5,0 g/L de K_2HPO_4 ; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/L de CaCl_2 ; 0,01 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas incubadas em estufa bacteriológica (DE LEO, Porto Alegre/RS) a 30 °C. O pH dos meios contendo glicose, glicerina ou glicerol foi ajustado para 6,5 utilizando soluções de NaOH e H_3PO_4 .

No estudo da influência da intensidade luminosa na velocidade de crescimento radial, o *Monascus ruber* foi inoculada em placas contendo meio BDA solidificado e os ensaios foram realizados em duplicata.

TABELA 3.1 – Concentração de substrato para determinação da velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* em placas de Petri.

Substrato	Concentração (g/L)		
	Glicose	Glicerina	Glicerol
Glicose 1%	10,0	-	-
Glicerol sintético 1%	-	-	10,0
Glicerina bruta 1%	-	10,0	-
Glicerina bruta 0,5 % + glicose 0,5 %	5,0	5,0	-
Glicerina bruta 3%	-	30,0	-
Glicerina loira 1%	-	10,0	-
Glicerina bi-destilada 1%	-	10,0	-

3.3.2 Influência da intensidade luminosa

Para a inoculação das placas, 2,0 mL de suspensão de esporos, obtidos através da adição de água estéril em tubos inclinados contendo o *Monascus ruber* cultivado em meio BDA, foram transferidos para a superfície das placas contendo meio solidificado.

Utilizou-se meio BDA ou meio solidificado contendo água destilada; glicerina bruta (20 g/L); ágar bacteriológico (20 g/L); glicina (5,0 g/L); K_2HPO_4 (5,0 g/L), KH_2PO_4 (5,0 g/L), CaCl_2 (0,1 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(0,01 g/L) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,03 g/L) (PASTRANA et al., 1995; HAJJAJ et al., 1999). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,5 utilizando soluções de NaOH e H_3PO_4 .

Para acompanhar a morfologia e o comportamento das colônias de *Monascus ruber* CCT 3802 utilizou-se um microscópio Bioval (WARSAWA, Holanda) com câmera de TV (ALDER CCTV, Phillipinas/Taiwan) acoplada. Foram retiradas amostras das placas e as lâminas foram preparadas com azul lactofenol algodão.

3.4 CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS ALETADOS

Os ensaios foram realizados em frascos de *Erlenmeyer* aletados de 1000 mL, contendo 360 mL de meio de cultura e 40 mL de inóculo de *Monascus ruber*. Os frascos foram incubados em agitador orbital horizontal a 30 °C e agitação de 140 rpm. Os cultivos tiveram duração média de 168 horas, sendo que a cada 24 horas, uma alíquota de 5,0 mL foi retirada para análise.

O inóculo de *Monascus ruber* foi preparado transferindo 10 mL de água estéril para garrafas de *Roux* contendo o microrganismo cultivado em meio BDA. A superfície foi raspada com alça de *Drigalski* e a suspensão obtida foi transferida para frascos aletados de 1000 mL contendo 400 mL de água destilada, 20 g/L de glicose, 5 g/L de glicina e sais na concentração apresentada na Tabela 3.2. Os frascos foram incubados em agitador orbital por 48 horas, sob frequência de agitação de 140 rpm e temperatura de 30 °C.

TABELA 3.2 – Composição de sais para os meios de cultivo e inóculos.

Componentes	Concentração (g/L)
KH_2PO_4	5,0
K_2HPO_4	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
MnSO_4	0,03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
CaCl_2	0,1

Fonte: PASTRANA et al. (1995) e HAJJAJ et al. (1999).

Foram avaliados os substratos glicerina bruta, glicerina loira, glicerina bi-destilada, glicerol e glicose. O meio contendo substrato e 360 mL de água destilada foi adicionado de fonte de nitrogênio (glicina, glutamato monossódico ou peptona) e sais, de acordo com o apresentado na Tabela 3.2.

Nos estudos da influência da intensidade luminosa, o meio de cultivo foi composto de glicerina bruta (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais (Tabela 3.2).

O pH inicial dos meios foi ajustado para 6,5 utilizando soluções de NaOH e H₃PO₄ e não foi controlado durante o processo. O final do cultivo foi definido quando observada diminuição na produção de pigmentos, aumento do valor do pH e concentração de biomassa constante.

3.5 CULTIVO EM BIORREATOR

Foram realizados ensaios em biorreator Bioflo III de 6 L (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, New Jersey/USA) com volume útil de 4 L. As seguintes condições de cultivos foram mantidas constantes: temperatura de 30 °C, agitação de 350 rpm e aeração de 1 vvm. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 6,5 utilizando soluções de NaOH e H₃PO₄ e não foi controlado durante o processo.

O biorreator contendo 3,6 L de meio de cultivo foi inoculado com 400 mL de inóculo. O inóculo foi obtido pela germinação de esporos de *Monascus ruber* em frascos aletados de 1000 mL, contendo 400 mL de meio de cultivo composto de água destilada, 20 g/L de glicose, 5 g/L de glicina e sais (Tabela 3.2), incubados por 60 horas a 30 °C em agitador orbital com agitação de 140 rpm (VENDRUSCOLO et al., 2010). A suspensão de esporos foi obtida através da adição de água estéril em tubos de ensaio contendo o microrganismo cultivado em meio BDA.

O meio de cultivo foi composto de água destilada, substrato (20 g/L), glicina como fonte de nitrogênio (5 g/L) e sais conforme apresentado na Tabela 3.2.

Nos estudos da influência da intensidade luminosa, o meio de cultivo foi composto de glicerina bruta (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais (Tabela 3.2).

O final do cultivo foi definido quando observada diminuição da produção de pigmentos e concentração de biomassa constante.

3.6 INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE LUMINOSA

Placas de Petri e frascos de *Erlenmeyer* aletados foram cobertos com filme colorido translúcido nas cores azul, amarelo, vermelho e verde e o crescimento e a produção de pigmentos foram comparados com placas e frascos submetidos a iluminação direta (luz branca) e a ausência de iluminação (filme preto). Como fonte de iluminação utilizaram-se lâmpadas fluorescentes compactas (ECONOLIFE TASCHIBRA, Brasil) de 15 W e 25 W. A iluminação foi contínua durante todo o cultivo.

De acordo com Babitha et al. (2008) e Velmurugan et al. (2010), o papel colorido translúcido permite apenas a passagem de uma luz de cor particular – as outras cores do espectro são filtradas.

Para verificar a influência da iluminação em biorreator Bioflo III foram realizados ensaios utilizando lâmpada Dicrónica (G_LIGHT 12 V, Brasil) coberta com filme colorido nas cores azul e vermelho e lâmpada sem filme (luz branca). A lâmpada foi fixada em tubo de borracha encaixado em saída localizada na tampa do equipamento e autoclavada juntamente com o meio. Após a esterilização, o fio isolado foi conectado à fonte de alimentação de energia.

Através de equipamento luxímetro digital (LUTRON LX 81, Brasil), foi determinada a iluminância (lux) nos ensaios em placas, frascos aletados e biorreator. O luxímetro calibrado foi posicionado a mesma distância da fonte de iluminação aos meios de cultivo em placas e frascos para determinação da iluminância média. A iluminância em biorreator foi determinada na superfície do meio de cultivo. As Figuras 3.2, 3.3 e 3.4 apresentam as dimensões e distância da fonte de iluminação aos meios de cultivo.

Foram realizadas 10 medidas de iluminância em diferentes pontos para determinação do valor médio da iluminância (E_m) e desvio padrão em cada situação. As placas e frascos foram movimentados para diferentes posições (distância da fonte de iluminação) durante os ensaios.

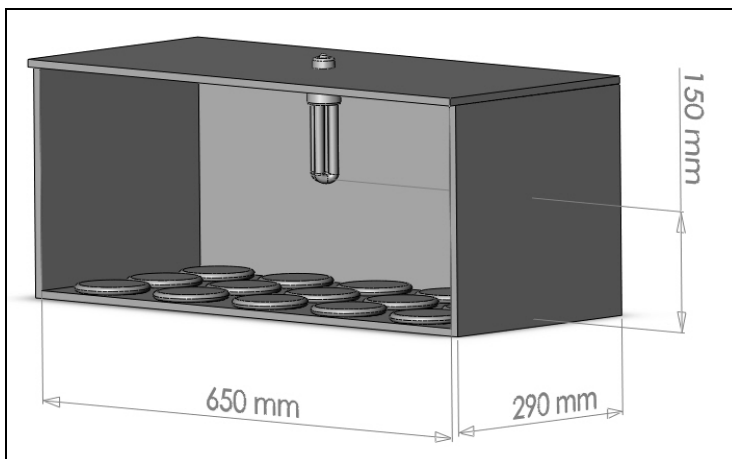


FIGURA 3.2 – Dimensões e distância da fonte de iluminação ao meio de cultivo em placas de Petri.

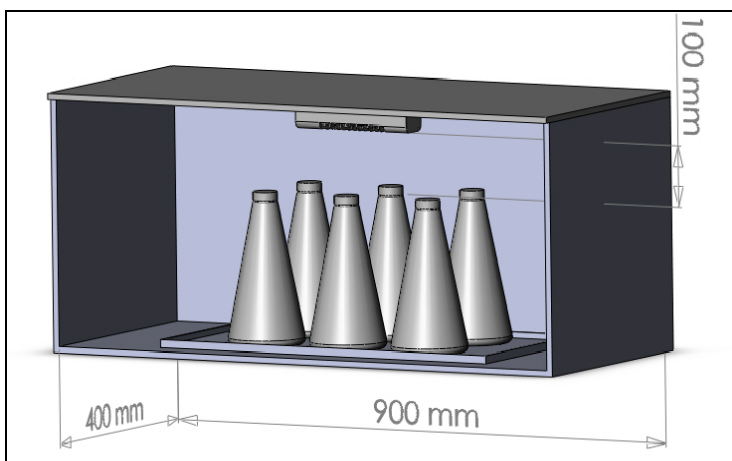


FIGURA 3.3 – Dimensões e distância da fonte de iluminação ao meio de cultivo em frascos agitados.

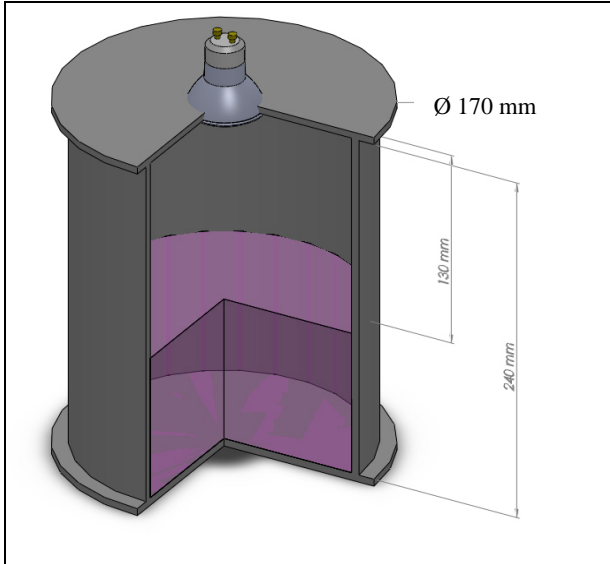


FIGURA 3.4 – Dimensões e distância da fonte de iluminação ao meio de cultivo em biorreator BIOFLO III.

3.7 ESTABILIDADE À LUZ

Para o estudo da estabilidade da cor à luz, o meio de cultivo contendo pigmentos de *Monascus* produzidos em cultivo submerso (frascos aletados) foi filtrado. Foram adicionados 400 mL de solução aquosa de 7,5 UA de pigmentos vermelhos em frascos aletados de *Erlenmeyer* cobertos com filme colorido, filme preto e sem filme.

Os frascos foram incubados a 30 °C por 192 horas com agitação de 140 rpm e expostos a fonte de iluminação contínua (lâmpada de 15 W). A iluminância média (E_m) foi determinada no interior dos frascos, com uso de luxímetro digital.

Uma amostra de 2,0 mL de cada frasco foi retirada no intervalo de 12 horas para quantificação dos pigmentos (absorbância).

3.8 METODOLOGIA ANALÍTICA

3.8.1 Determinação da biomassa

A biomassa foi quantificada por gravimetria. Uma quantidade de 5,0 mL do meio de cultivo foi filtrada em papel Filtro Quantitativo (UNIFIL) e o material retido submetido a secagem em forno micro-ondas (CONSUL FACILITE MIDDY, Brasil) durante 15 minutos sob potência de 180 W (HAMANO et al., 2005; OROZCO e KILIKIAN, 2008). O conjunto foi resfriado em dessecador por 15 minutos e depois pesado em balança analítica BEL ENGINEERING (Monza, Itália, precisão = 0,1 mg) para a determinação da biomassa seca, obtendo-se a quantidade de biomassa retida em um volume conhecido. O filtrado foi utilizado para quantificação dos pigmentos, pH e substrato residual.

3.8.2 Quantificação dos pigmentos

As amostras filtradas foram analisadas em espectrofotômetro (SPECTRUM SP-1100 SERIES MODELO SP-105) nos seguintes comprimentos de onda: 510 nm para a quantificação de pigmento vermelho, 470 nm para pigmento laranja e 400 nm para pigmento amarelo (LEE et al., 1995; SUH e SHIN et al., 2000; HU, Z. et al., 2012). Foram realizadas diluições com água destilada para quantificação dos pigmentos em amostras com leitura de absorbância maiores que 0,8.

Vendruscolo (2009) observou na varredura dos pigmentos extraídos da biomassa produzida em cultivos de *Monascus ruber* CCT 3802, a formação de picos na região de 470 nm (pigmentos laranja) e 510 nm (pigmentos vermelhos) em valores de pH do meio de 5,0 a 10,0. A varredura dos pigmentos extraídos da biomassa cultivada em pH 4,0 apresentou picos na região de 400 nm e 470 nm para pigmentos laranja.

3.8.3 Determinação do pH

O filtrado foi submetido a leitura de pH em pHmetro digital (LUTRON – Modelo PH 221, Brasil).

3.8.4 Determinação da glicose

Para a determinação de açúcares redutores foi utilizado o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme metodologia proposta por Miller

et al. (1959), em espectrofotômetro (SPECTRUM SP-1100 SERIES MODELO SP-105) a 540 nm e comparado com uma curva padrão de glicose na faixa de 0 a 3 g/L.

3.8.5 Determinação do glicerol

A determinação do glicerol residual no meio de cultivo foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC PERKIN EIMER SERIES 200, Brasil) utilizando detector de índice de refração através de metodologia modificada da proposta por CARDOSO (2008).

As amostras filtradas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos em microcentrífuga (HSIANGTAI MACHINERY MCD-2000, Taiwan) e o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 μm . O filtrado foi congelado em refrigerador (BOSCH, Brasil) a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetido a liofilização em Liofilizador L101 (LIOBRAS, São Carlos/Brasil). O desidratado foi ressuspensionado em 1,0 mL de solução de H_2SO_4 0,04 M. Foram utilizadas as seguintes condições:

- Coluna: Vertisep GES C18 HPLC 4,6 x 250 mm, 5 μm VERTICAL;
- Temperatura da coluna: $65\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Temperatura do detector: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Eluente: Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,04 M;
- Vazão: 0,8 mL/min;

A curva de calibração obtida com solução padrão de glicerina bi-distilada está apresentada na Figura 3.5 O tempo de retenção na coluna para o glicerol foi em torno de 3,7 minutos.

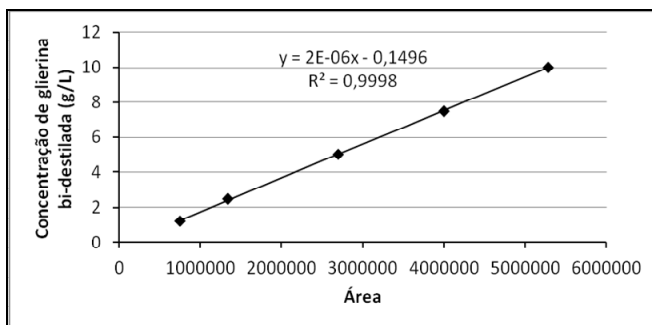


FIGURA 3.5 – Curva de calibração para determinação de glicerol residual no meio de cultivo.

3.8.6 Parâmetros cinéticos

As relações utilizadas nos cálculos dos parâmetros cinéticos estão baseadas nas relações apresentadas por Schmidell et al. (2001).

As velocidades específicas máximas de crescimento, durante a fase exponencial de crescimento, dos ensaios em frascos agitados foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo, de acordo com a Equação 3.2.

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{máx}t \quad (3.2)$$

Sendo:

X: biomassa ao longo da fase exponencial (g/L);

X₀: biomassa no início da fase exponencial (g/L);

μ_{máx}: velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹);

t: tempo (h);

A produtividade média em células (P_{células}) foi calculada pela diferença entre a maior concentração celular (biomassa) e a concentração celular (biomassa) inicial dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme Equação 3.3.

$$P_{células} = \frac{(X_{MÁX_t}) - (X_{t_0})}{t - t_0} \quad (3.3)$$

Sendo:

P_{células}: produtividade média de crescimento (formação de células) no instante de tempo (t - t₀) (g/L.h);

X_{máxt}: máxima concentração de biomassa no instante de tempo t;

X_{t₀}: biomassa no tempo t₀;

t: tempo para atingir o valor máximo da concentração de biomassa;

t₀: tempo inicial do cultivo;

A produtividade média de produção de pigmentos foi calculada pela diferença entre o maior valor de absorbância (UA) e a absorbância inicial (UA₀) dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme Equação 3.4.

$$P_M = \frac{(UA_t) - (UA_{t_0})}{t - t_0} \quad (3.4)$$

Sendo:

P_M : produtividade média de formação de pigmentos no instante de tempo $(t - t_0)$ (UA/h);

UA_t : absorvância no instante de tempo t ;

UA_{t_0} : absorvância no tempo t_0 ;

t : tempo para atingir o valor máximo de absorvância;

t_0 : tempo inicial do cultivo;

As velocidades específicas nos ensaios em biorreator foram determinadas pelas equações 3.5, 3.6 e 3.7, através do alisamento dos resultados.

$$\mu_P = \frac{1}{X} * \frac{dP}{dt} \quad (3.5)$$

$$\mu_X = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} \quad (3.6)$$

$$\mu_S = -\frac{1}{X} * \frac{dS}{dt} \quad (3.7)$$

Sendo:

μ_P : velocidade específica de produção de pigmentos (UA/g.h);

μ_X : velocidade específica de crescimento (h^{-1});

μ_S : velocidade específica de consumo de substrato (g/g.h);

X : concentração de biomassa (g/L);

S : concentração de substrato (g/L);

P : quantidade de pigmentos (UA);

t : tempo (h);

Os fatores de conversão de substrato em biomassa foram obtidos a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (biomassa) contra a quantidade de substrato, de acordo com as Equações 3.8 e 3.9.

$$Y_{X/S} = -\frac{X}{S} \quad (3.8)$$

$$Y_{X/G} = -\frac{X}{G} \quad (3.9)$$

Sendo:

$Y_{X/S}$: fator de conversão de glicose em biomassa (g/g);

$Y_{X/G}$: fator de conversão de glicerol em biomassa (g/g);

X: concentração de biomassa (g/L);

S: concentração de glicose (g/L);

G: concentração de glicerol (g/L);

Os fatores de conversão de substrato em pigmentos foram obtidos a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (pigmento) contra a quantidade de substrato, de acordo com as Equações 3.10 e 3.11.

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} \quad (3.10)$$

$$Y_{P/G} = -\frac{dP}{dG} \quad (3.11)$$

Sendo:

$Y_{P/S}$: fator de conversão de glicose em pigmentos;

$Y_{P/G}$: fator de conversão de glicerol em pigmentos;

P: quantidade de pigmentos (UA);

G: concentração de glicerol (g/L);

S: concentração de glicose (g/L);

O fator de conversão de biomassa em pigmentos foi obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (pigmento) contra a quantidade de biomassa, de acordo com a Equação 3.12.

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad (3.12)$$

Sendo:

$Y_{P/S}$: fator de conversão de biomassa em pigmentos;

P: quantidade de pigmentos (UA);

X: concentração de biomassa (g/L);

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GLICERINA

Para verificar a influência da composição das amostras de glicerina na produção de pigmentos e no crescimento de *Monascus ruber*, foram realizadas análises físico-químicas para caracterizá-las. A Tabela 4.1 apresenta as propriedades físico-químicas das glicerinas e do glicerol utilizados como substrato para a produção de pigmentos por *Monascus ruber*.

TABELA 4.1 – Propriedades físico-químicas das amostras de glicerina e glicerol utilizadas no presente trabalho.

Propriedade	Glicerina bruta	Glicerina loira	Glicerina bi-destilada	Glicerol*
pH	5,42	6,90	9,91	9,80
Densidade (kg/m ³)	1.272,2	1.259,8	1.261,8	1.260,0
Umidade	10,71%	9,05%	0,16%	Max. 0,5%
Teor de glicerol	72%	86%	99%	Mínimo 99,5%
Cinzas	6,49%	5,45%	< 0,10%	-

*Informações do fabricante Vetec.

Os valores encontrados para as análises físico-químicas realizadas demonstram que existe diferença na composição das amostras, com maior quantidade de água e de cinzas e menor quantidade de glicerol na amostra de glicerina bruta, que não sofreu tratamento de purificação. Os valores encontrados para a amostra de glicerina bi-destilada estão próximos aos encontrados para glicerol (sintético) e os resultados encontrados para as amostras de glicerina bruta e glicerina loira estão próximos aos encontrados na literatura.

A matéria-prima (óleo vegetal ou gordura animal) e o processo de obtenção do biodiesel influenciam nas características do produto final e também da glicerina. Existe diferença entre as glicerinas derivadas de mesmo óleo e influência da fonte vegetal utilizada.

De acordo com Mota et al. (2009), as propriedades físico-químicas da glicerina dependem do método e do óleo ou gordura usados para a fabricação do biodiesel. A principal diferença entre os tipos de óleos vegetais (ou gorduras) é a quantidade de ácidos graxos livres.

Estes ácidos estão associados com os triglicerídeos e poluentes que produzem odor, cor, mudança de estado físico, afetando a qualidade da glicerina ou do biodiesel.

Não foi possível determinar o perfil de ácidos graxos nas amostras devido à quantidade de lipídeos totais ser inferior a 0,05 g em 100 g de amostra, conforme relatório de ensaio expedido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

Em amostras de glicerina bruta derivada da produção de biodiesel a partir de óleo de soja, Hu, S. et al. (2012) verificaram na análise do perfil de ácidos graxos que as amostras apresentaram maiores concentrações de ácido oleico, ácido linoleico e ácido palmítico. Em algumas amostras, não conseguiram determinar o perfil de ácidos graxos devido à concentração ser inferior à detectável pela metodologia.

4.2 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM PLACAS DE PETRI

4.2.1 Determinação da velocidade de crescimento radial em placas contendo diferentes substratos

O crescimento de *Monascus ruber* em placas de Petri com meio de cultivo sólido foi avaliado e a velocidade de crescimento radial determinada. Essa metodologia possibilita a seleção de microrganismos e meios de cultura e a avaliação do efeito do substrato nos fatores de crescimento.

A Tabela 4.2 apresenta as médias dos resultados obtidos para as medidas dos raios (mm) das colônias nas placas contendo glicerina, glicose, glicerol e meio BDA.

A Tabela 4.3 apresenta as equações lineares, o coeficiente de correlação e a velocidade de crescimento radial em milímetros por dia para o crescimento radial de *Monascus ruber* em cada meio.

TABELA 4.3 – Equação linear para o crescimento de *Monascus ruber*.

Meio	Equação de regressão	R ²	V _{cr} (mm/dia)
Glicose 1%	r = 0,0769t + 0,5	0,93	1,85
Glicerol 1%	r = 0,0815t + 0,5	0,96	1,96
Glicerina bruta 1%	r = 0,0841t + 0,5	0,96	2,02
Glicerina bruta 3%	r = 0,0840t + 0,5	0,92	2,02
Glicerina bruta 0,5 %	r = 0,0761t + 0,5	0,93	1,83
% + Glicose 0,5 %	r = 0,0762t + 0,5	0,90	1,83
Glicerina loira 1%	r = 0,0762t + 0,5	0,90	1,83
Glicerina bi-destilada 1%	r = 0,0773t + 0,5	0,90	1,86
BDA	r = 0,0719t + 0,5	0,97	1,73

Os resultados de velocidade de crescimento radial encontrados foram comparados pela análise de variância (ANOVA). Pelo teste de Tukey realizado com uso do *software* Action (ESTATCAMP, São Carlos/Brasil) obteve-se o valor de $F = 1,711$. Como $F_{0,05,7,16} = 2,66$, pode-se dizer que não há diferença significativa entre as velocidades de crescimento radial encontradas ao nível de significância de 0,05. Todos os resultados apresentaram uma boa linearidade, com coeficiente de correlação $R^2 > 0,90$.

Carvalho et al. (2005) determinaram a velocidade média de crescimento radial de quatro linhagens de *Monascus purpureus* em meio BDA a 30°C. Para estas linhagens encontraram velocidades entre 2,3 e 3,1 mm/dia, velocidades próximas às encontradas para o *Monascus ruber*.

Em ensaios anteriores encontrou-se velocidade de crescimento radial variando de 1,58 mm/dia a 1,71 mm/dia em placas contendo diferentes concentrações de glicerol como único substrato (MEINICKE, 2008). Vendruscolo (2009) estudou a influência do pH no crescimento de *Monascus ruber* e obteve crescimento de 0,0762 mm/h em placas com meio BDA e pH 6,5.

As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam o crescimento do *Monascus ruber* em 336 horas e em 264 horas, respectivamente, nas placas de Petri com os diferentes meios.

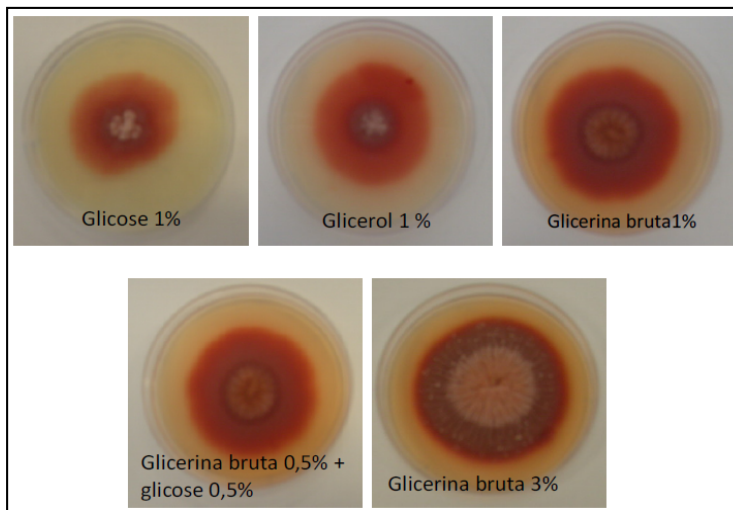


FIGURA 4.1 – Crescimento e pigmentação do *Monascus ruber* em placas de Petri em 336 horas.

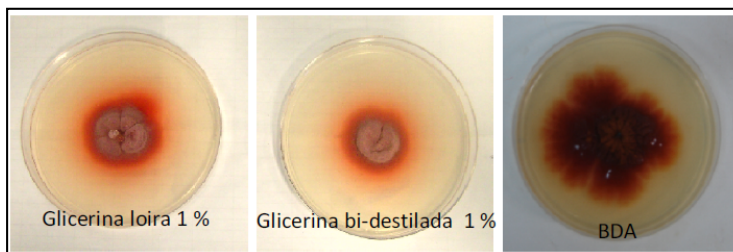


FIGURA 4.2 – Crescimento e pigmentação do *Monascus ruber* em placas de Petri em 264 horas.

Observou-se crescimento e produção de pigmentos em todas as placas indicando que tanto a glicerina bruta como as purificadas podem ser utilizadas como substrato para crescimento de *Monascus ruber* e produção de pigmentos. Foram observadas colônias planas, circulares, flocosas e com aumento da pigmentação com o tempo em todas as placas.

Considerando a ausência de diferença significativa para as velocidades de crescimento radial determinadas e a pigmentação das colônias, pode-se utilizar o resíduo glicerina bruta como substrato para a obtenção dos pigmentos de *Monascus*.

4.2.2 Influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos

Placas de Petri contendo meio BDA e meio solidificado composto de glicerina bruta, glicina, sais e ágar foram inoculadas com *Monascus ruber*, viradas para cima e expostas a uma fonte de iluminação contínua. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,5 e avaliou-se o crescimento e a produção de pigmentos.

Foram realizados ensaios com lâmpadas de potência de 15 W e de 25 W e a iluminância média (Em) foi determinada em cada situação (Tabela 4.4).

TABELA 4.4 – Valores de iluminância média (Em) e temperatura de incubação.

Lâmpada de 15 W			Lâmpada de 25 W		
Em (lux)	Área (cm ²)	Temp. (°C)	Em (lux)	Área (cm ²)	Temp. (°C)
4.952 ± 749	1.920	30,4	8.456 ± 1798	1.920	31,8

Verificou-se crescimento e produção de pigmentos nas placas cobertas com filme preto (ausência de luz) e inibição de crescimento nas placas expostas diretamente à luz. Esse comportamento também pôde ser observado em placas parcialmente cobertas com filme preto. Não houve crescimento e produção de pigmentos na parte exposta à luz (Figuras 4.3, 4.4 e 4.5).

As iluminâncias médias de 4.952 e 8.456 lux inibiram igualmente o crescimento nas placas expostas diretamente à luz, porém, houve maior produção de pigmentos nas placas expostas à iluminância de 4.952 lux.

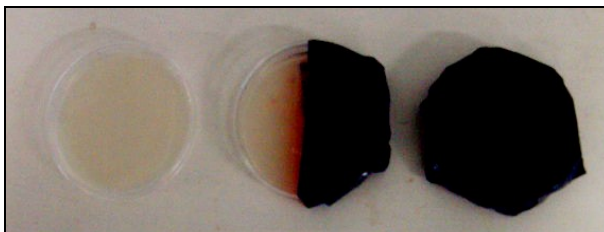


FIGURA 4.3 – Placas de Petri sem filme, parcialmente cobertas com filme preto e cobertas com filme preto, expostas à fonte de iluminação.

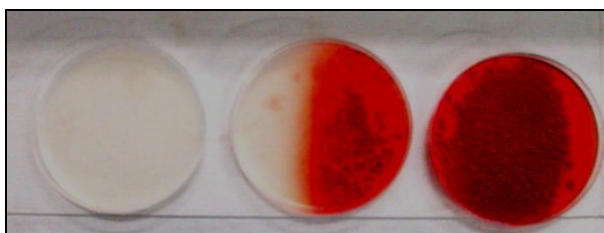


FIGURA 4.4 – Crescimento de *Monascus ruber* após 14 dias de incubação em placas contendo meio composto de glicerina bruta, glicina e sais, expostas a iluminância média de 4.952 lux (lâmpada de 15 W).

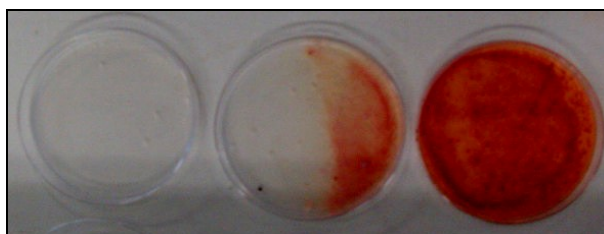


FIGURA 4.5 – Crescimento de *Monascus ruber* após 14 dias de incubação em placas contendo meio composto de glicerina bruta, glicina e sais, expostas a iluminância média de 8.456 lux (lâmpada de 25 W).

Em meio BDA (controle) observou-se o mesmo comportamento (Figuras 4.6, 4.7 e 4.8). Houve menor formação de colônias, com menor pigmentação, nas placas expostas diretamente à luz (sem filme preto). Por ser o BDA um meio que favorece o crescimento de fungos

filamentosos, houve maior desenvolvimento das colônias, com maior produção de pigmentos nas placas. Observou-se grande crescimento e intensa produção de pigmento vermelho nas placas mantidas na ausência de luz, para as duas condições de iluminância.

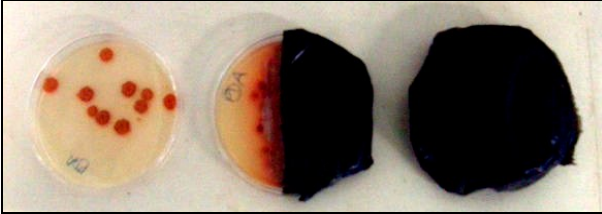


FIGURA 4.6 – Placas de Petri sem filme, parcialmente cobertas com filme preto e cobertas com filme preto, expostas à fonte de iluminação.

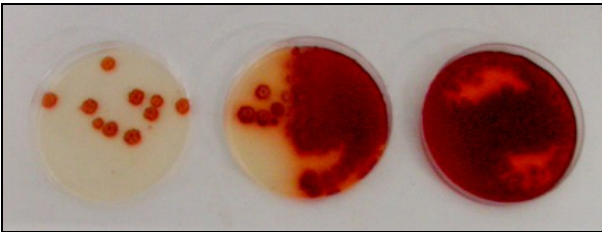


FIGURA 4.7 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas contendo meio BDA expostas à iluminância média de 4.952 lux (lâmpada de 15 W).



FIGURA 4.8 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas contendo meio BDA expostas à iluminância média de 8.456 lux (lâmpada de 25 W).

Babitha et al. (2008) efetuaram iguais observações a respeito da influência da luz em placas cobertas com filme preto e expostas a

iluminação. Os autores observaram que colônias de *Monascus purpureus* que cresceram em ausência de luz apresentaram crescimento abundante de hifas, dando uma aparência aveludada às colônias e micélio muito pigmentado. Isso confirmou a função inibitória da luz na produção de pigmentos por *Monascus purpureus*. Essa observação sugere que a incubação em total escuridão é mais efetiva na indução de produção de pigmentos.

As colônias que cresceram em iluminação direta não mostraram produção de pigmentos, o que pode ser explicado pelo postulado da existência de fotoreceptores que apresentam resposta para o escuro e para luz nos fungos (BABITHA et al., 2008).

4.2.3 Influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos em placas cobertas com filme colorido

Placas de Petri inoculadas com o *Monascus ruber* foram cobertas com filme colorido e expostas a fonte de iluminação contínua para verificar a influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos. As cores testadas foram: vermelho, azul, verde e amarelo (Figuras 4.9 e 4.10).

Foram realizadas aberturas no filme, nas laterais das placas, para facilitar a entrada de oxigênio. Conforme observado por Vendruscolo et al. (2009) em garrafas de *Roux*, existe crescimento esbranquiçado do micélio quando não ocorre a oxigenação.

A iluminância média correspondente a cada cor foi determinada com luxímetro coberto com o filme colorido e exposto à fonte de iluminação à mesma distância das placas. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.5.

TABELA 4.5 – Valores de Iluminância média (*Em*) determinadas para o interior das placas cobertas com filme colorido.

Filme	Faixa de comprimento de onda (nm) (VELMURUGAN et al., 2010)	<i>Em</i> (lux) – Lâmpada de 15 W	<i>Em</i> (lux) – Lâmpada de 25 W
Vermelho	622 - 760	439 ± 68	677 ± 162
Azul	455 - 492	702 ± 71	1.080 ± 305
Verde	492 - 577	898 ± 101	1.270 ± 310
Amarelo	577 - 597	3.820 ± 632	7.120 ± 862

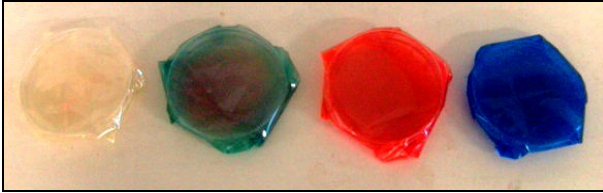


FIGURA 4.9 – Placas de Petri cobertas com filme colorido contendo meio glicerina bruta, glicina e sais. Da esquerda para a direita: filme amarelo, filme verde, filme vermelho e filme azul.

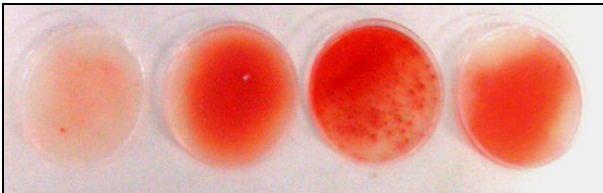


FIGURA 4.10 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas contendo meio glicerina bruta, glicina e sais, expostas à lâmpada de 15 W (sequência de filme colorido conforme Figura 4.9).

Verificou-se crescimento e produção de pigmentos em todas as placas, porém, o crescimento foi menor na placa exposta à luz amarela. Houve inibição do crescimento e da produção de pigmentos na placa coberta com o filme amarelo devido à inibição causada pela luz, como observado nas placas expostas diretamente à fonte de iluminação.

Nas placas cobertas com os filmes nas cores verde, vermelho e azul houve produção de pigmentos e crescimento em menor intensidade do que observado nas placas cobertas com filme preto (ausência de luz). Na placa coberta com filme vermelho, a produção de pigmentos foi maior em relação às outras cores. Isso indica que a luz em vários comprimentos de onda e o valor da iluminância interferem no crescimento e na produção de pigmentos, sendo um fator que deve ser observado na pesquisa do *Monascus ruber*. Esse comportamento foi observado em placas contendo meio BDA e em placas contendo meio composto de glicerina bruta, glicina e sais.

Observou-se que nas colônias expostas à luz vermelha ou na ausência de luz houve maior formação de micélio aéreo dando um

aspecto aveludado às colônias. Nas placas expostas à luz direta, amarela, verde e azul as colônias foram menores e não houve a formação abundante de micélio, tornando a aparência das colônias mais plana.

Babitha et al. (2008) em ensaios em placas inoculadas com *Monascus purpureus*, verificaram que em luz vermelha foram formadas colônias com crescimento aéreo do micélio. Quando a luz azul foi usada, foi observada uma redução no tamanho das colônias e com a luz verde, as colônias planas formadas não apresentaram diferença significativa no tamanho das que cresceram em luz azul.

Em iluminância de 6.000 lux, Zheng et al. (2009) verificaram que o micélio do fungo *Inonotus obliquos* cresceu mais rápido em placas contendo meio BDA, expostas à escuridão (ausência de luz) do que em placas cobertas com filme vermelho e filme azul, indicando que a luz regula o crescimento micelial do fungo pertencente à classe dos basidiomicetos.

A influência da intensidade luminosa e do comprimento de onda no crescimento, conidiação e biossíntese de fumosina por *Fusarium verticillioides* foi estudada por Fanelli et al. (2012). O crescimento foi estimulado em placas expostas à luz vermelha (627 nm) e luz azul (470 e 455 nm) em comparação às placas na ausência de luz. Porém, o aumento da iluminância de 200 para 1.700 lux, diminuiu a biossíntese de fumosina.

Outro ensaio foi realizado com exposição das placas à lâmpada de 25 W. O crescimento e a produção de pigmentos foram avaliados em meio BDA (Figura 4.11) e meio contendo glicerina bruta, glicina e sais. Verificou-se maior inibição na produção de pigmentos nas placas cobertas com filme amarelo e na placa coberta com filme vermelho, a produção foi maior.

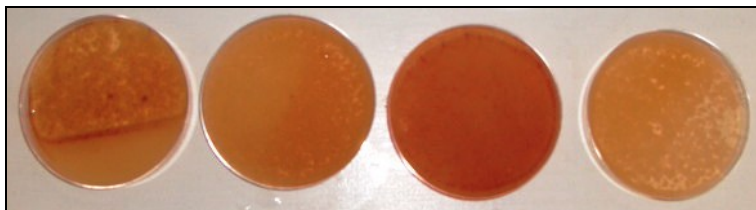


FIGURA 4.11 – Crescimento e produção de pigmentos após 14 dias de incubação em placas com meio BDA expostas a fonte de iluminação de 25 W e cobertas com filme verde, azul, vermelho e amarelo (conforme sequência da esquerda para a direita).

Em maiores valores de iluminância, obtidos nas placas expostas à iluminação direta e cobertas com filme amarelo, houve inibição da produção de pigmentos. As maiores produções de pigmento e de crescimento foram observadas nas placas expostas à ausência de luz (filme preto) e placas com filme vermelho, onde foi determinado menor valor de iluminância.

4.2.3.1 Observação em microscópio

As figuras no Apêndice A apresentam o micélio das colônias, do crescimento em placas, observadas em microscópio com câmera de TV acoplada. A Figura 1A apresenta as colônias formadas em meio composto de glicerina bruta, glicina e sais, expostas à lâmpada de 15 W e a Figura 2A apresenta as colônias formadas em meio composto de glicerina bruta, glicina e sais, expostas à lâmpada de 25 W.

Observa-se maior formação de estruturas de reprodução nas colônias expostas à luz direta e cobertas com filme amarelo, verde e azul e maior formação de hifas (micélio) nas colônias cobertas com filme vermelho e filme preto (ausência de luz). Isso pode indicar que a luz vermelha e a ausência de luz favorecem a formação das colônias. Contudo, em condições adversas (iluminação direta) houve maior formação de estruturas de reprodução que não se desenvolveram, o que inibiu a produção de pigmentos.

Babitha et al. (2008) observaram que as colônias de *Monascus purpureus* que cresceram em meio PYD na ausência de luz apresentaram desenvolvimento abundante de hifas aéreas. Em luz vermelha, o crescimento de micélio aéreo também foi abundante. Contudo, as colônias expostas à luz azul, luz verde e luz direta foram menores e de aparência achatada (planas).

A formação abundante de hifas e a ausência de estruturas de reprodução indicam que o crescimento foi favorecido, com isso, existe maior formação de pigmentos. Nos cultivos onde essas estruturas de reprodução são encontradas, o desenvolvimento do fungo foi mais lento e houve menor produção dos metabólitos de interesse: os pigmentos.

Quase todos os fungos, quando cultivados em condições favoráveis e abundância de carboidratos de fácil assimilação, crescem rapidamente formando abundante micélio, e quando as condições tendem a deter o crescimento por falta de nutrientes, eles formam corpos de frutificação ou estruturas de reprodução (LACAZ, 1984).

Nos estudos de Fanelli et al. (2012), a incubação de *Fusarium verticillioides* em placas expostas à luz em maiores comprimentos de

onda (vermelho a amarelo) aumentou a sua conidiação em relação às placas incubadas na ausência de luz. A incubação em iluminância de 200 lux reduziu a conidiação, porém, em condições de 1700 lux, o número de conídeos foi igual ao produzido nas placas na ausência de luz, com redução da biosíntese de fumonisina pelo microrganismo. Os menores comprimentos de onda induziram maiores níveis de esporulação.

Lee, K. et al. (2006) observaram que ocorre maior desenvolvimento de hifas aéreas em períodos sem luz no cultivo do fungo filamentosso *Magnaporthe oryzae*. Não foram observadas hifas aéreas no micélio que se desenvolveu exposto à iluminação direta, o que indicou um desenvolvimento assexuado limitado.

Para Purschwitz et al. (2008), o desenvolvimento sexuado, com formação de cleistotécios, em *Aspergillus nidulans* é favorecido em condições de cultivo na ausência de luz (escuridão). Um grande número de conídios e esporos é produzido quando o fungo é exposto à luz.

Outros autores como Carels e Shepherd (1975) também estudaram o ciclo reprodutivo das células de *Monascus* spp. em cultivo submerso. Observaram que as condições de cultivo influenciam na variação do tamanho das estruturas de reprodução. Assim, o acompanhamento da morfologia é importante para o conhecimento das melhores condições de cultivo para obtenção de maior rendimento na produção de pigmentos.

4.2.4 Determinação da velocidade de crescimento radial em placas cobertas com filme colorido e expostas a fonte de iluminação

Placas contendo meio BDA cobertas com filme amarelo, vermelho, azul, verde e preto e placas sem filme foram inoculadas com *Monascus ruber* e expostas a fonte de iluminação contínua. Aberturas no filme, na lateral das placas, foram realizadas para facilitar a entrada de oxigênio.

A iluminância média determinada com uso de luxímetro foi de 4.256 lux e a temperatura de incubação foi de 31,3 °C. As placas em duplicata foram expostas à fonte de iluminação por 264 horas e mediu-se o diâmetro das colônias em intervalos de 24 ou 48 horas. A Figura 4.12 apresenta as curvas de crescimento radial e as Figuras 4.13 e 4.14 apresentam as colônias ao final do ensaio. A Tabela 4.6 apresenta as velocidades encontradas para cada placa.

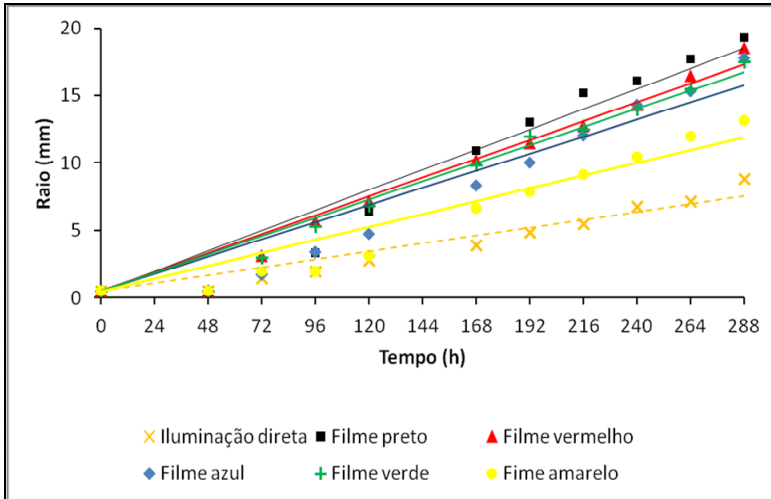


FIGURA 4.12 – Curva de crescimento radial de *Monascus ruber* em placas cobertas com filme colorido e expostas a iluminância de 4.256 lux.

TABELA 4.6 – Equação linear para o crescimento de *Monascus ruber* em placas cobertas com filme colorido e expostas a 4.256 lux de iluminância.

Placa	Equação de regressão	R ²	V _{cr} (mm/dia)
Iluminação direta (luz branca)	$r = 0,0245t + 0,5$	0,93	0,59 ^a
Filme preto (Ausência de luz)	$r = 0,0625t + 0,5$	0,94	1,50 ^b
Filme vermelho	$r = 0,0584t + 0,5$	0,97	1,40 ^b
Filme azul	$r = 0,0530t + 0,5$	0,92	1,27 ^b
Filme verde	$r = 0,0563t + 0,5$	0,97	1,35 ^b
Filme amarelo	$r = 0,0396t + 0,5$	0,92	0,95 ^a

a,b Velocidades com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$).



FIGURA 4.13 – Placas inoculadas com *Monascus ruber* e cobertas com filme colorido. Da esquerda para a direita: filme vermelho, filme verde, filme amarelo, filme azul, filme preto e placa sem filme.



FIGURA 4.14 – Produção de pigmentos e crescimento de *Monascus ruber* em placas cobertas com filme colorido (conforme sequência da Figura 4.13) após 288 horas de exposição à iluminância de 4.256 lux.

As maiores velocidades de crescimento radial foram observadas nas placas cobertas com filme vermelho (1,40 mm/dia) e ausência de luz (1,50 mm/dia) e a menor velocidade foi determinada na placa exposta à luz branca (sem filme).

Os resultados de velocidade de crescimento radial encontrados foram comparados por análise de variância (ANOVA). Pelo teste de *Tukey* obteve-se o valor de $F = 27,04$. Como $F_{0,05,5,6} = 4,39$, pode-se dizer que há diferença significativa entre as velocidades de crescimento radial encontradas ao nível de significância de 0,05.

A análise estatística indicou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de velocidade determinados nas placas cobertas com filme amarelo e sem filme, em relação às outras placas, indicando inibição do crescimento na presença de luz (maiores valores de iluminância). Para as placas com filme preto, azul, verde e vermelho não observou-se diferença significativa entre os valores de velocidade de crescimento radial determinados. Os resultados estão apresentados no Apêndice B.

As colônias com maior pigmentação foram observadas nas placas cobertas com filme vermelho e filme preto. A ausência de luz, assim como o filme vermelho, favorecem o crescimento e a pigmentação do *Monascus ruber* em meio BDA.

Nas placas sem filme e com filme amarelo, não observou-se pigmentação das colônias e produção de pigmentos dissolvidos no meio, indicando inibição da produção de pigmentos pela luz.

Em placas inicialmente expostas à fonte de iluminação não foi observado o crescimento da colônia de *Monascus ruber*. Porém, após a incubação dessas placas em ausência de luz (filme preto), a colônia se desenvolveu, apresentando crescimento e pigmentação. De acordo com Schmidt-Heydt et al. (2011), a luz tem um efeito de estagnação, mas não de inativação sobre os micélios aéreos e esporos. Se uma colônia que não cresceu quando exposta à luz é submetida à ausência de luz (escuro), ela cresce normalmente.

4.3 CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS ALETADOS E AGITADOS

4.3.1 Avaliação dos substratos glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-distilada para o crescimento e a produção de pigmentos por *Monascus ruber*

Realizou-se uma série de cultivos de *Monascus ruber* utilizando glicose, glicerol, glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-distilada na concentração de 20 g/L como substratos, 5 g/L de glicina como fonte de nitrogênio e sais, com pH inicial do meio ajustado para 6,5.

As Figuras 4.15 e 4.16 apresentam a produção de biomassa e de pigmentos vermelhos. A Figura 4.17 apresenta a produção de pigmentos nos frascos de *Erlenmeyer* aletados em 168 horas de cultivo.

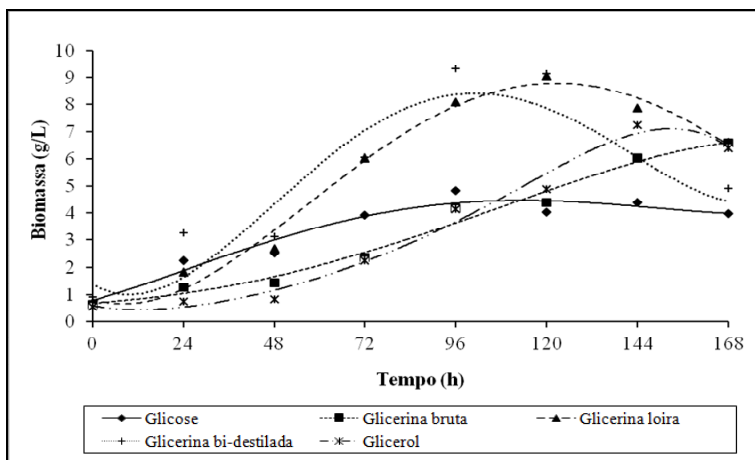


FIGURA 4.15 – Produção de biomassa em cultivos de *Monascus ruber* em frascos agitados utilizando diferentes substratos.

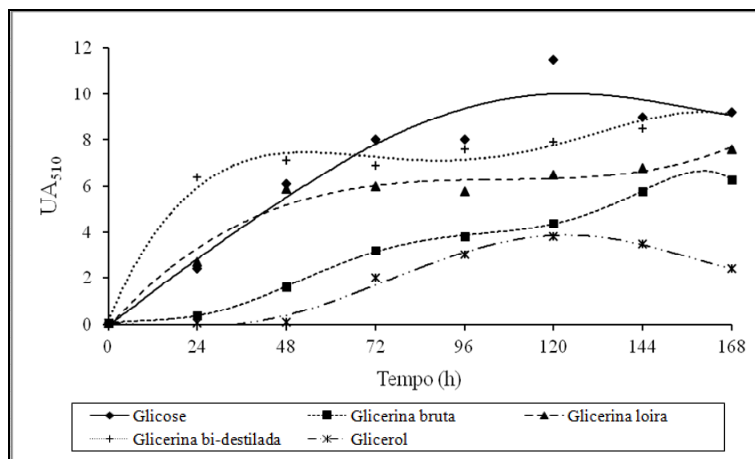


FIGURA 4.16 – Produção de pigmento vermelho (UA₅₁₀) em cultivos de *Monascus ruber* em frascos agitados utilizando diferentes substratos.



FIGURA 4.17 – Produção de pigmentos em frascos aletados, em 168 horas de cultivo, utilizando os substratos, da esquerda para a direita: glicose, glicerina bruta, glicerina loira, glicerina bi-distilada e glicerol.

Observou-se maior formação de biomassa nos frascos contendo glicerina bi-distilada e glicerina loira como substratos, em torno de 8,4 g/L. Para a produção de pigmentos, maiores valores de absorvância foram observados nos frascos contendo glicose (11,45 UA) e glicerina bi-distilada (9,14 UA) e a menor produção de pigmentos foi observada no frasco contendo glicerol (3,77 UA). O pH permaneceu estável, em torno de 6,5, em todos os cultivos.

Os cultivos tiveram duração de 168 horas e a fase de crescimento iniciou em 48 horas para os cultivos contendo glicerina loira, bruta e bi-distilada e 24 horas para o cultivo contendo glicose como substrato. Para o substrato glicerol, foi observado início da fase de crescimento após 72 horas de cultivo, indicando uma maior fase de adaptação do microrganismo. Após 120 horas observou-se diminuição da produção de biomassa nos frascos contendo glicose, glicerina bi-distilada e glicerina loira e após 144 horas, observou-se diminuição do crescimento nos frascos contendo glicerol e glicerina bruta.

Para o frasco contendo glicose como substrato, a máxima produção de pigmentos foi observada em 120 horas de cultivo, após o término da fase de crescimento do microrganismo, concordando com o observado por HAMANO e KILIKIAN (2006) e HU, Z. et al. (2012). Durante a fase inicial do cultivo, o fungo utiliza carbono e nitrogênio como substratos para a produção de metabólitos primários, bioconversão, produção de energia, gás carbônico e água. Na última fase de crescimento, os fungos produzem os metabólitos secundários como pigmentos, citrulina e mevinolina (PATTANAGULL et al., 2008).

Nos frascos contendo glicerina loira, bi-destilada, bruta e glicerol, a produção máxima de pigmentos foi observada durante a fase de crescimento. Hamano et al. (2005) estudaram o cultivo de diferentes cepas de *Monascus ruber* e *Monascus purpureus* em frascos aletados de 500 mL, contendo 100 ml de meio de cultivo e 10 g/L de glicose como substrato. Os autores observaram que a fase de crescimento finalizou em 20 a 25 horas de cultivo e a produção de pigmento vermelho foi parcialmente associada ao crescimento. A máxima produção de biomassa ocorreu entre 5,9 a 8,8 g/L, com produção máxima de pigmentos vermelhos (intracelulares e extracelulares) variando de 8 UA a 20,4 UA.

Pastrana et al. (1995) realizaram ensaios com glicose como substrato, em frascos de 250 mL, e obtiveram como máxima produção 6 UA de pigmento vermelho e 7 g/L de biomassa. Jiefeng et al. (2010) obtiveram máxima produção de biomassa de 4,4 g/L e 1,6 UA de pigmento vermelho em frascos aletados contendo glicose como substrato e incubados em agitação de 120 rpm.

Em cultivos de *Monascus ruber* em frascos de 1000 mL, contendo 200 mL de meio de cultivo composto de 5 g/L de glicose, 5 g/L de glutamato monossódico e sais, Hajjaj et al. (2000) observaram máxima produção de 1,8 g/L de biomassa e 8 UA de pigmento vermelho após 90 horas de cultivo.

Em ensaios anteriores, também em frascos aletados de 1000 mL contendo glicerol sintético como substrato, observou-se máxima produção de pigmento vermelho em torno de 7,0 UA e biomassa de 5 g/L. Para ensaios com glicose foi observada produção de 6 g/L de biomassa e 10 UA de pigmento vermelho (MEINICKE, 2008).

A menor produção de pigmentos utilizando apenas glicerol como substrato, nesses ensaios, pode estar relacionada ao menor crescimento observado devido à morfologia do fungo. Quando *pellets* menores e micélio filamentosos são formados, o crescimento e a produção de pigmentos em cultivo submerso é mais eficiente (KIM et al., 2002). Quando *pellets* maiores são formados, a transferência de oxigênio no meio de cultivo e no *pellet* é menor, limitando o crescimento do *Monascus* spp. e a produção de pigmentos (PASTRANA et al., 1995; HAJJAJ et al., 1999).

Em cultivos em frascos agitados utilizando glicose como substrato, Hamdi et al., (1997) observaram formação de 10 g/L de biomassa e produção de 15 UA de pigmento vermelho em 96 horas de cultivo. A formação dos metabólitos foi influenciada pela morfologia do

micélio. Os *pellets* formados pelas hifas e ramificações do fungo em formato de algodão favoreceram a produção de pigmentos.

A diferença no comportamento do fungo em cultivos com diferentes substratos indica a complexidade do metabolismo de formação dos pigmentos e conversão do substrato, sendo importante o estudo das condições de cultivo para a obtenção dos pigmentos em maior escala.

A Tabela 4.7 apresenta os dados cinéticos velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), máxima produção de pigmentos (UA) e a produtividade média de pigmentos (P_M) para os cinco cultivos. As velocidades máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) durante a fase exponencial foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo e as figuras estão apresentadas no Apêndice C.

TABELA 4.7 – Grandezas cinéticas do cultivo de *Monascus ruber* em frascos utilizando diferentes substratos.

	Glicose 20 g/L	Glic. bruta 20 g/L	Glic. loira 20 g/L	Glic. bi- destilada 20 g/L	Glice- rol 20 g/L
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,012	0,016	0,023	0,023	0,016
Máx. produção de biomassa (g/L)	4,12	5,94	8,38	8,43	6,68
$P_{\text{células}}$ (g/L.h)	0,043	0,035	0,070	0,088	0,046
P_M pig. vermelho (UA_{510}/h)	0,095	0,037	0,040	0,054	0,031
P_M pig. laranja (UA_{470}/h)	0,091	0,036	0,040	0,056	0,025
P_M pig. amarelo (UA_{400}/h)	0,095	0,037	0,040	0,055	0,031
Máx. pig. vermelho (UA_{510})	11,45	6,31	7,60	9,14	3,77
Máx. pig. laranja (UA_{470})	10,90	6,06	7,53	9,41	3,66
Máx. pig. amarelo (UA_{400})	11,33	6,20	7,32	9,24	3,69

A maior velocidade específica de crescimento foi observada nos cultivos realizados com glicerina bi-destilada e glicerina loira ($0,023 \text{ h}^{-1}$). Para Hajjaj et al. (2000), a máxima velocidade específica de

crescimento observada em cultivos de *Monascus ruber* com glicose como substrato foi de $0,035 \text{ h}^{-1}$.

Os valores de produtividade média de pigmentos vermelhos, laranja e amarelos foram maiores no frasco contendo glicose como único substrato, onde a máxima produção de pigmentos foi observada em 120 horas de cultivo. A máxima produção de pigmentos nos cultivos realizados com glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-destilada foi observada em 168 horas de cultivo e no frasco contendo glicerol, a máxima produção de pigmentos foi observada em 144 horas de cultivo.

As substâncias presentes na glicerina, como sais e álcool, não inibiram o crescimento e a produção de pigmentos por *Monascus ruber* em cultivos submersos e placas de Petri. A glicerina bruta, sem tratamento prévio, pode ser utilizada como substrato, pois houve produção e liberação de pigmentos no meio de cultivo. A glicerina loira e a glicerina bi-destilada, assim como o glicerol, também são substratos para a produção de pigmentos de *Monascus*.

Apesar da diferença no teor de água, pH e teor de glicerol nos co-produtos avaliados, houve crescimento e produção de pigmento vermelho, com valores superiores a 6 UA_{510} , próximos aos encontrados por outros autores utilizando resíduos e açúcares como substratos em frascos agitados (PASTRANA et al., 1995; HAMDÍ et al. 1996; MORITZ, 2005; HAMANO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2008).

Para dar continuidade e verificar a influência da glicose e da glicerina no crescimento e na produção de pigmentos, foram realizados cultivos com diferentes concentrações e composição de substrato. A Tabela 4.8 apresenta as composições estudadas, sendo os resultados apresentados nas Figuras 4.18 e 4.19.

TABELA 4.8 – Composição do substrato utilizado no cultivo de *Monascus ruber* em frascos agitados.

Frasco	Substrato
A	Glicose 20 g/L
B	Glicerina bruta 20 g/L
C	Glicerina bruta 40 g/L
D	Glicose 10 g/L e Glicerina bruta 10 g/L
E	Glicose 10 g/L e Glicerol 10 g/L

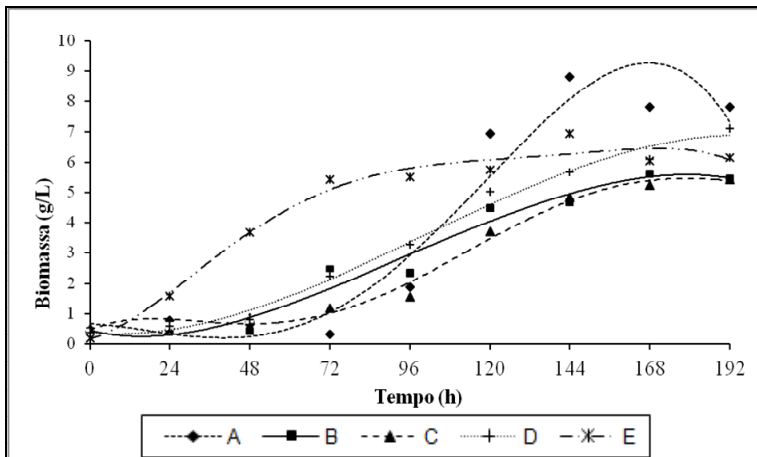


FIGURA 4.18 – Produção de biomassa em cultivos de *Monascus ruber* em frascos de *Erlenmeyer* com diferentes composições de substrato (A = 20 g/L de glicose, B = 20 g/L de glicerina bruta, C = 40 g/L de glicerina bruta, D = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerina bruta, E = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerol).

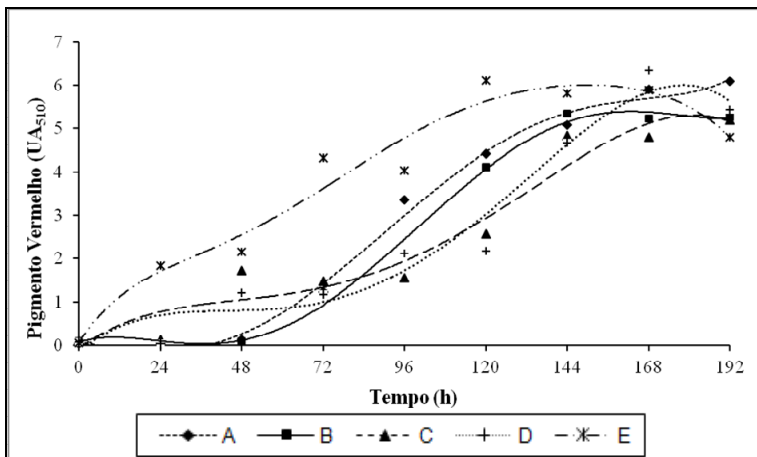


FIGURA 4.19 – Produção de pigmento vermelho em cultivos de *Monascus ruber* em frascos de *Erlenmeyer* com diferentes composições de substrato (A = 20 g/L de glicose, B = 20 g/L de glicerina bruta, C = 40 g/L de glicerina bruta, D = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerina bruta, E = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerol).

O maior crescimento foi observado no cultivo contendo apenas glicose (8,36 g/L de biomassa). Nos cultivos contendo glicerina bruta como único substrato, a produção máxima foi em torno de 5,0 g/L, não havendo influência da concentração de glicerina no crescimento. Nos cultivos contendo glicerina e glicose observou-se produção de 6,7 g/L de biomassa. A glicose favoreceu o crescimento, comportamento também observado por outros autores (PASTRANA et al., 1995) e estudos anteriores (MEINICKE, 2008).

Observou-se maior produção e produtividade de pigmento vermelho nos cultivos (A), (D) e (E), que continham glicose na composição. A máxima produção de pigmento vermelho observada foi de 6,25 UA. Nos cultivos apenas com glicerina bruta, a produção foi de 5,20 UA, não havendo influência do aumento da concentração de glicerina na produção dos pigmentos.

A concentração de 40 g/L de glicerina bruta no meio de cultivo não favoreceu o crescimento e a produção de pigmentos, possivelmente devido às características do meio de cultivo. A maior concentração de óleos e impurezas presentes na glicerina bruta pode ter dificultado a aeração do meio de cultivo e limitado o crescimento do microrganismo.

O término da fase de crescimento foi observado em 144 horas de cultivo para os frascos (A), (B), (C) e (D), com máxima produção de pigmentos após essa fase. Para o cultivo (E) observou-se o término da fase de crescimento em 72 horas, com máxima produção de pigmento vermelho em 120 horas de cultivo.

Nos microrganismos, como fungos filamentosos, o metabolismo primário envolve as vias de síntese de produtos intermediários de baixa massa molecular, objetivando a produção de energia para as reações de biossíntese de macromoléculas essenciais para a estrutura e o funcionamento celular. O metabolismo secundário em fungos compreende vias de síntese de compostos que, a princípio, não apresentam papel essencial ao crescimento e que são sintetizados a partir de precursores de energia gerados ao longo do metabolismo primário (ADRIO e DEMAIN, 2003).

Os dados cinéticos determinados para os cultivos estão apresentados na Tabela 4.9 e os valores estão próximos aos obtidos nos ensaios realizados com os co-produtos glicerina loira, bi-distilada e bruta e glicose e glicerol, com produção de pigmentos durante a fase de crescimento.

TABELA 4.9 – Grandezas cinéticas do cultivo de *Monascus ruber* em frascos com diferentes concentrações e composição de substrato.

	A	B	C	D	E
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,023	0,017	0,025	0,017	0,025
Máx. produção de biomassa (g/L)	8,36	5,20	4,93	6,71	6,74
$P_{\text{células}}$ (g.L/h)	0,058	0,031	0,026	0,035	0,047
P_{M} pig. vermelho (UA_{510}/h)	0,032	0,036	0,026	0,037	0,050
Máx. pig. vermelho (UA_{510})	6,06	5,20	5,07	6,25	6,04

Legenda: (A = 20 g/L de glicose, B = 20 g/L de glicerina bruta, C = 40 g/L de glicerina bruta, D = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerina bruta, E = 10 g/L de glicose e 10 g/L de glicerol).

A adição de glicose à glicerina pode ser uma alternativa para aumentar a produtividade e diminuir a fase de adaptação do *Monascus ruber* ao meio de cultivo, pois a glicose favorece a produção de energia e piruvato para o crescimento e produção de pigmentos devido ao seu alto nível de energia e facilidade de assimilação pelos seres vivos.

A glicose apresenta seis carbonos em sua molécula e o glicerol três carbonos. Apesar do número de moléculas de carbono ser menor para a concentração de 20 g/L de substrato, existe produção de pigmentos e crescimento, indicando que a glicerina bruta pode ser utilizada como substrato pelo *Monascus ruber*.

Assim, através dos ensaios realizados, pode-se concluir que o glicerol presente no meio de cultivo, em condições aeróbias, pode ser transportado pela membrana celular e transformado através de duas rotas, em dihidroxiacetonafofato, precursor do piruvato, ocorrendo a formação de Acetil-CoA, precursor de metabólitos secundários como os pigmentos vermelhos (Figura 4.20).

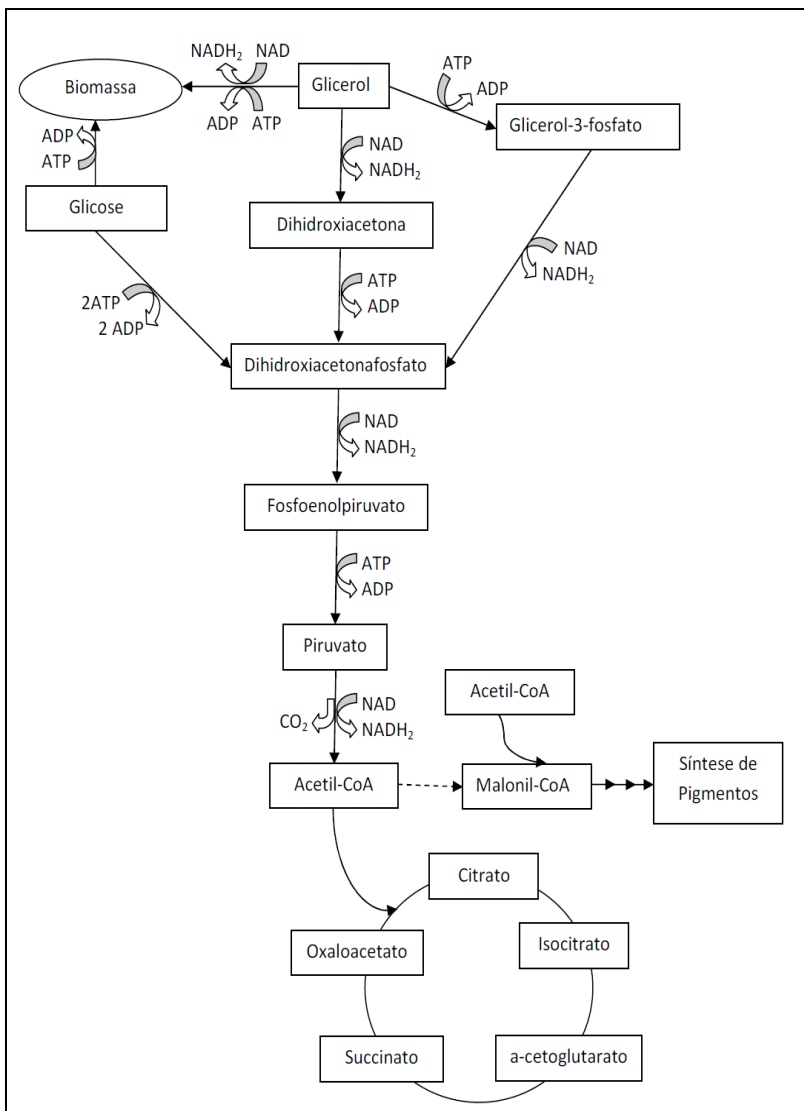


FIGURA 4.20 – Via metabólica de *Monascus ruber* para formação de pigmentos e biomassa a partir de glicose e glicerol.

4.3.2 Influência da fonte de nitrogênio em cultivos utilizando glicerina bruta como substrato

A produção de pigmentos vermelhos e o crescimento do microrganismo utilizando diferentes fontes de nitrogênio foram avaliados em cultivo submerso utilizando glicerina bruta na concentração de 20 g/L como substrato. A Tabela 4.10 apresenta as fontes de nitrogênio avaliadas.

TABELA 4.10 – Concentração e fontes de nitrogênio avaliadas.

Fonte de Nitrogênio	Concentração (g/L)
Glicina	5,0
Glicina	9,0
Peptona	5,0
Glutamato monossódico	5,0

As Figuras 4.21 e 4.22 apresentam a produção de biomassa e de pigmento vermelho nos cultivos utilizando diferentes fontes de nitrogênio.

A maior produção de biomassa e de pigmentos foi observada no cultivo contendo 9,0 g/L de glicina, que produziu pigmento vermelho equivalente a 5,87 UA, seguido do cultivo contendo 5,0 g/L de glicina, com produção de 5,24 UA. No cultivo contendo glutamato monossódico, a produção máxima foi de 4,18 UA de pigmento vermelho. A menor produção foi observada no cultivo contendo apenas peptona, com produção máxima de 2,19 UA de pigmento vermelho. A Figura 4.23 apresenta a produção de pigmentos nos frascos em 192 horas de cultivo.

O uso de aminoácidos no meio de cultivo tem sido utilizado como estimulante do acúmulo extracelular dos pigmentos, contribuindo para o aumento da produtividade de pigmento vermelho, pois o pigmento reage com os grupos amino no meio, formando pigmentos solúveis em água (PASTRANA et al., 1995).

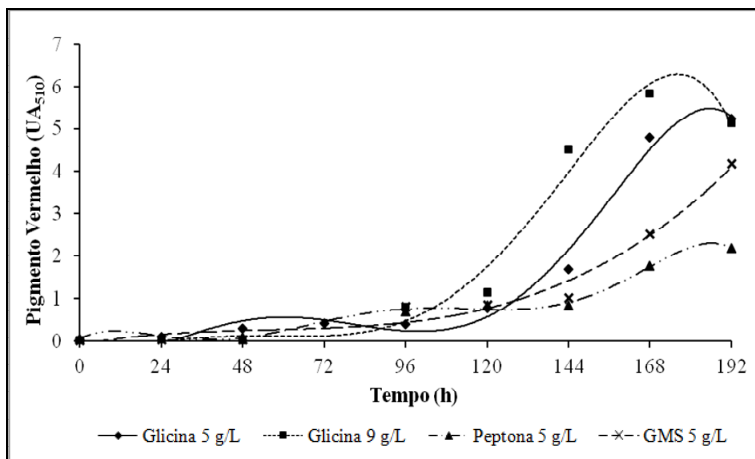


FIGURA 4.21 – Produção de pigmento vermelho em cultivo de *Monascus ruber* com diferentes fontes de nitrogênio.

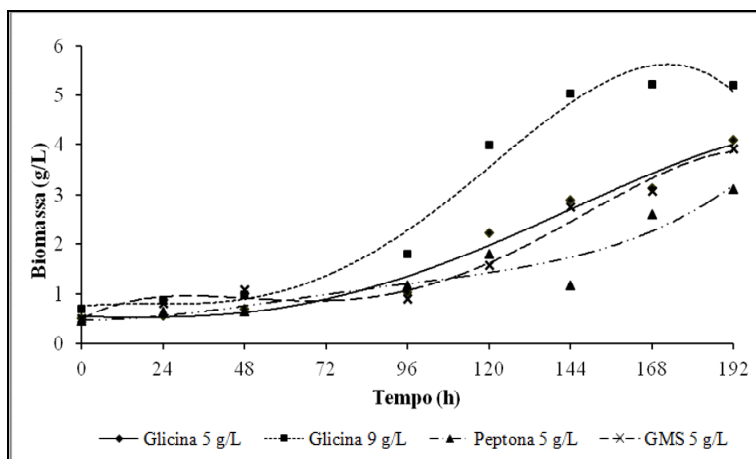


FIGURA 4.22 – Produção de biomassa em cultivo de *Monascus ruber* com diferentes fontes de nitrogênio.

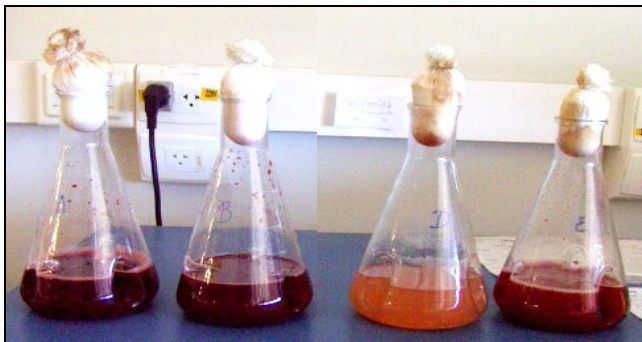


FIGURA 4.23 – Produção de pigmentos em 192 horas no cultivo de *Monascus ruber* com diferentes fontes de nitrogênio. Da esquerda para a direita: glicina 5,0 g/L, glicina 9,0 g/L, peptona 5,0 g/L e GMS 5,0 g/L.

De acordo com a Figura 4.24, maiores produtividades de formação de células e de pigmento vermelho foram encontradas nos frascos contendo glicina, podendo esse aminoácido ser utilizado como fonte de nitrogênio em cultivos realizados com glicerina bruta como único substrato.

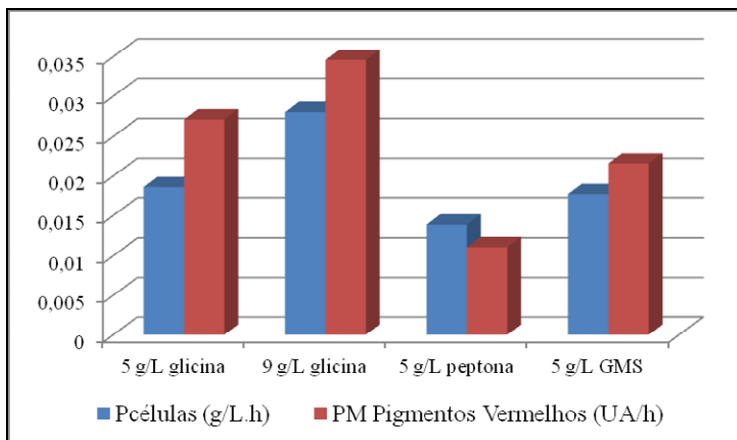


FIGURA 4.24 – Produtividade em células e de pigmento vermelho para o cultivo de *Monascus ruber* em frascos de *Erlenmeyer* com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio.

Conforme estudos realizados por Moritz (2005), a glicina favorece a produção e a liberação de pigmentos vermelhos no meio de cultivo e menores valores de concentração de citrulina são observados. Vendruscolo (2009) utilizou a glicina como fonte de nitrogênio em cultivos submersos de *Monascus ruber*.

Em estudos anteriores (MEINICKE et al., 2012), realizados em cultivos de *Monascus ruber* em frascos agitados, utilizando glicerol como único substrato e glutamato monossódico como fonte de nitrogênio, foram obtidos 7,38 UA de pigmento vermelho, com produtividade média de 0,058 UA/h e 8,44 g/L de biomassa. Cultivos contendo concentrações superiores a 20 g/L de glicerol e 5 g/L de GMS favoreceram a produção de pigmento vermelho e o crescimento de *Monascus*.

Lee et al. (2001) estudaram a influência da fonte de nitrogênio no crescimento e na produção de pigmentos em cultivos de *Monascus purpureus* em frascos de 250 mL e verificaram que o nitrato de amônia, o nitrato de sódio e o glutamato monossódico apresentaram os melhores resultados para a produção de pigmentos. Em cultivos utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio, foi observada maior formação de biomassa, com menor produtividade específica de produção de pigmento vermelho.

A fonte de nitrogênio é um fator muito importante no crescimento e na produção de pigmentos, pois cultivos com ausência de fonte de nitrogênio não apresentam formação de pigmentos solúveis em água. Os pigmentos são produzidos principalmente na célula (intracelular). A substituição de oxigênio nas estruturas de pigmentos pelo nitrogênio do grupo amino de compostos como aminoácidos, peptídeos e proteínas, aumenta a produção de pigmentos vermelhos (BABITHA et al., 2006).

4.3.3 Influência do pH do meio em cultivos utilizando glicerina bruta como substrato

A fim de avaliar a influência do pH do meio de cultivo na produção de pigmentos em frascos de *Erlenmeyer* contendo 20 g/L de glicerina bruta como substrato, 5 g/L de glicina como fonte de nitrogênio e sais, realizou-se uma série de ensaios onde o pH inicial do meio foi ajustado. Quando não sofre nenhum ajuste, o pH do meio de cultivo permanece na faixa de 6,5.

Os valores de pH avaliados foram: 2,5; 4,5; 5,5 e 8,5. As Figuras 4.25, 4.26, 4.27 e 4.28 apresentam a produção de pigmentos amarelo,

laranja e vermelho e a variação do pH em função do tempo para os ensaios realizados.

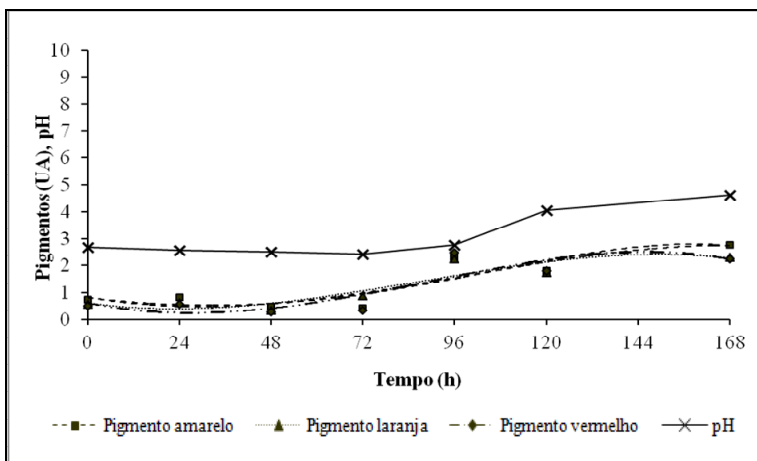


FIGURA 4.25 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de *Monascus ruber* com pH inicial 2,5.

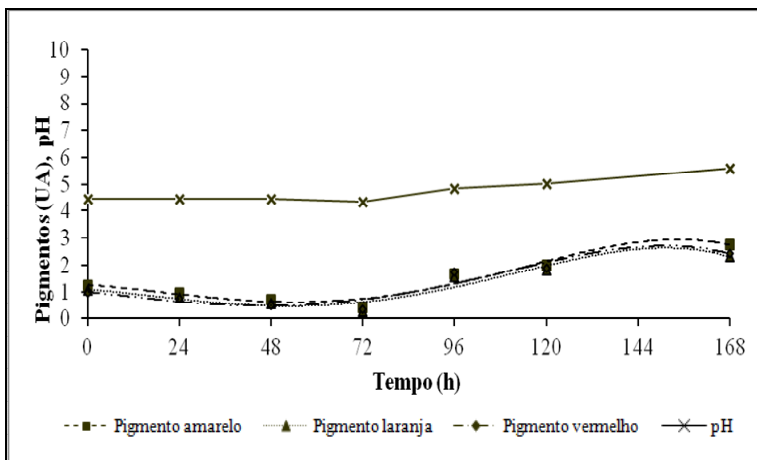


FIGURA 4.26 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de *Monascus ruber* com pH inicial 4,5.

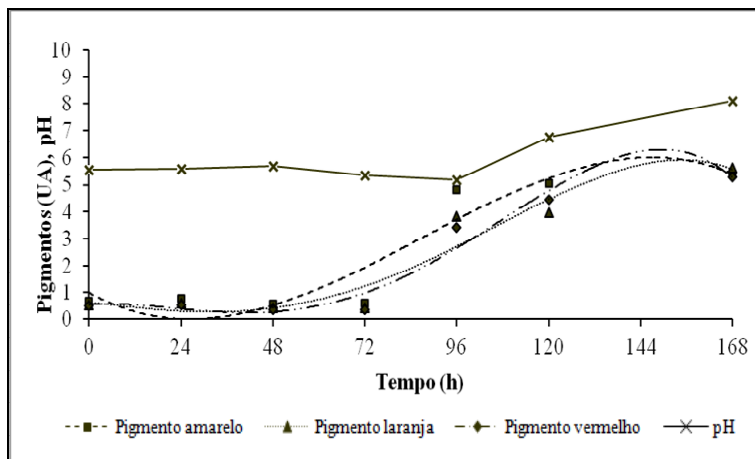


FIGURA 4.27 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de *Monascus ruber* com pH inicial 5,5.

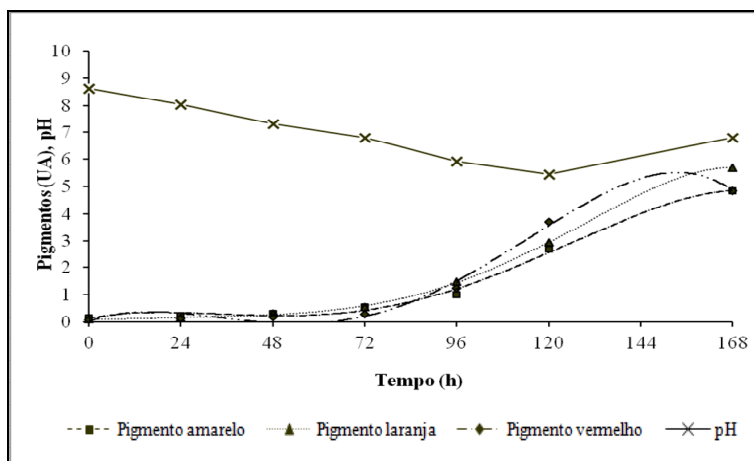


FIGURA 4.28 – Produção de pigmentos e variação do pH do meio para o cultivo de *Monascus ruber* com pH inicial 8,5.

A maior produção de pigmentos foi observada nos frascos com ajuste do pH do meio de cultivo para 5,5, seguido do frasco com pH 8,5, com máxima produção de 5,30 UA e 4,85 UA de pigmentos vermelhos, respectivamente. Nos frascos com ajuste de pH do meio de cultivo para 2,5 e 4,5 observou-se menor produção de pigmentos vermelhos (2,43 UA).

De acordo com Vendruscolo et al. (2009), existe um efeito tamponante da glicina em cultivos de *Monascus ruber* realizados em valores de pH abaixo de 4,0, o que impede a formação de pigmentos vermelhos.

Nos frascos com pH inicial do meio 2,5; 4,5 e 5,5, verificou-se um aumento do valor do pH no final do cultivo, que pode estar relacionado à liberação dos pigmentos no meio. Quando os pigmentos são liberados no meio de cultivo, o pH permanece igual ou superior devido ao metabolismo do microrganismo (TENG e FELDHEIM, 2001).

No frasco com pH inicial em 8,5 verificou-se uma diminuição do pH, seguido de um pequeno aumento no final do cultivo, comportamento similar ao observado por Dominguez-Espinosa e Webb (2003) em cultivos submersos com pH inicial do meio em 6,5.

Para Babitha et al. (2006), em pH 2,0 e 2,5, em cultivos com glicose, não houve crescimento. Em pH 4,0 o crescimento foi máximo com um aumento da produção de pigmentos nos valores de pH de 4,5 a 7,5.

Mukherjee e Singh (2011) também verificaram em cultivos submersos de *Monascus purpureus*, em frascos agitados contendo glicose como substrato, que a composição de pigmentos é variável com a mudança do pH do meio. Pigmentos vermelhos foram maiores em pH 6,0 a 8,0, porém, em pH ácido, a produção de pigmentos amarelos foi maior. Em pH 2,0 a 4,0, a produção de pigmentos amarelos foi dominante, porém diminuiu bruscamente em pH 5,0. A produção de pigmentos laranja permaneceu estável em toda faixa de pH estudada.

Conforme Orozco et al. (2003), o pH do cultivo assume uma importância fundamental para a ativação de enzimas que participam do metabolismo secundário em fungos filamentosos. Variações no pH do meio de cultivo do gênero *Monascus* spp. alteram a proporção entre os diversos pigmentos produzidos e também a sua liberação no meio (principalmente dos pigmentos vermelhos). O melhor valor para a fase de crescimento é em torno de 5,5 e para a produção de pigmentos em torno de 6,5. A mudança do pH de cultivo ainda pode acarretar mudanças na morfologia do microrganismo. Com isso, a adequação e o controle do valor do pH em cultivos de *Monascus* spp. é importante no sentido de favorecer a obtenção de maior quantidade de pigmento vermelho.

Em valores de pH do meio de cultivo na faixa de 5,5 a 8,5, a produção de pigmento vermelho é favorecida em relação a valores de

pH ácidos, devido ao efeito do pH no transporte dos constituintes do meio de cultivo, como glicose e fonte de nitrogênio (LEE et al., 2001).

Em cultivos submersos em pH ácidos, os pigmentos permanecem intracelulares nos micélios devido à baixa solubilidade desses pigmentos em meios ácidos. Valores maiores de pH facilitam a remoção dos pigmentos do micélio e estão associados à conversão química dos pigmentos laranja em vermelhos (HAMDI et al., 1997).

Além da maior liberação de pigmentos em valores de pH 5,0 a 8,0, a estabilidade dos pigmentos em meios alcalinos é maior do que a verificada em valores de pH ácidos (FABRE et al., 1993 e CARVALHO et al., 2005).

Observou-se inibição na produção de pigmentos nos ensaios realizados com a glicerina bruta em meio de cultivo ácido, semelhante ao comportamento encontrado na literatura para estudos com glicose como principal substrato. Esse comportamento demonstra a importância do controle do pH do meio para maior crescimento e liberação de pigmentos vermelhos também em meio de cultivo composto de resíduos, como o co-produto do biodiesel.

4.3.4 Influência da intensidade luminosa em cultivo submerso de *Monascus ruber*

Para avaliar a influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos em cultivo submerso, utilizando glicerina bruta como substrato, foram realizados ensaios em frascos de *Erlenmeyer* cobertos com filme colorido, expostos a fonte de iluminação contínua e incubados a 30 °C em agitador orbital (Figura 4.29).

Uma amostra de cada frasco foi retirada a cada 24 horas para determinação da produção de pigmentos, biomassa e valor do pH do meio de cultivo. A iluminância média na superfície dos frascos foi determinada com uso de luxímetro. Para determinar a iluminância média aproximada no interior dos frascos com filme colorido, o luxímetro foi posicionado em béquer coberto com filme colorido e exposto a fonte de iluminação à mesma distância dos frascos de *Erlenmeyer*.



FIGURA 4.29 – Cultivo submerso de *Monascus ruber* em frascos aletados cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação contínua.

A iluminância média determinada no interior dos frascos com filme vermelho foi menor do que nos outros frascos cobertos com filme colorido e sem filme (Tabela 4.11).

Verificou-se produção de biomassa e formação de pigmentos em todos os frascos. A Figura 4.30 apresenta os frascos cobertos com filme colorido e a Figura 4.31 apresenta os frascos sem os filmes coloridos, após 216 horas de cultivo, expostos à fonte de iluminação (lâmpada 15 W).

TABELA 4.11 – Valores de iluminância média (Em) no interior dos frascos de *Erlenmeyer* cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação.

	Comprimento de onda (nm)	Em (lâmpada 15 W)	Em (lâmpada 25 W)
Filme vermelho	622 – 760	481 ± 67	831 ± 284
Filme amarelo	577 – 597	1.076 ± 215	1.968 ± 294
Filme azul	455 – 492	832 ± 181	1.379 ± 294
Filme verde	492 – 577	845 ± 203	1.456 ± 302
Luz direta (sem filme)	-	1.248 ± 501	2.688 ± 810



FIGURA 4.30 – Frascos aletados cobertos com filme colorido. Da esquerda para a direita: frasco sem filme (iluminação direta), filme amarelo, filme verde, filme azul, filme vermelho e filme preto.



FIGURA 4.31 – Produção de pigmentos em 216 horas de cultivo de *Monascus ruber* em frascos aletados cobertos com filme colorido conforme sequência na Figura 4.30.

A Figura 4.32 apresenta a evolução da produção de pigmentos vermelhos em todos os frascos. Verificou-se maior produção de pigmentos no frasco coberto com filme vermelho, com máxima formação de 8,32 UA de pigmentos vermelhos, seguido do frasco coberto com filme preto (ausência de luz) com formação de 7,17 UA de pigmentos vermelhos. A menor produção de pigmentos foi observada no frasco exposto diretamente à luz (4,48 UA de pigmentos vermelhos) e nos frascos cobertos com filme nas cores verde, amarelo e azul a produção de pigmentos vermelhos ficou em torno de 6,20 UA.

Verificou-se que a luz direta inibe a formação de pigmentos extracelulares pelo *Monascus ruber*. A inibição da produção de pigmentos em frascos expostos a luz direta (sem filme) e o aumento da produção em frascos na ausência de luz ou expostos a luz vermelha também foram observados em cultivos submersos de *Monascus purpureus* (BABITHA et al., 2008, VELMURUGAN et al., 2010).

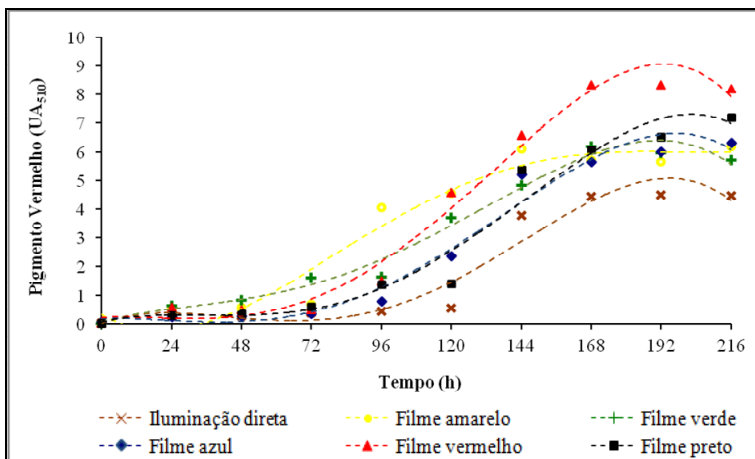


FIGURA 4.32 – Produção de pigmentos vermelhos em cultivo de *Monascus ruber* em frascos agitados cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação (lâmpada fluorescente de 15 W).

A Figura 4.33 apresenta a evolução da formação de biomassa nos frascos.

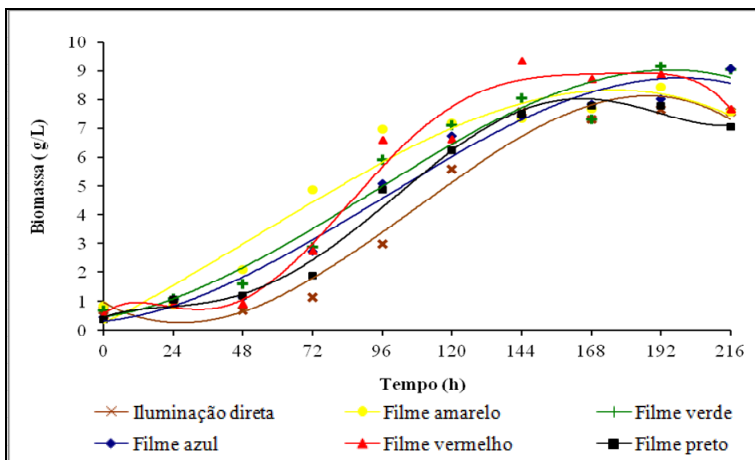


FIGURA 4.33 – Formação de biomassa em cultivos de *Monascus ruber* em frascos agitados cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação (lâmpada fluorescente de 15 W).

A máxima formação de biomassa nos frascos cobertos com filme verde, azul e vermelho foi em torno de 8,5 g/L e no frasco expostos à luz e coberto com filme preto (ausência de luz), houve formação de 7,0 g/L de biomassa.

A Tabela 4.12 apresenta os dados cinéticos para cada frasco. As velocidades máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) durante a fase exponencial foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo e as figuras estão apresentadas no Apêndice D.

TABELA 4.12 – Grandezas cinéticas de cultivo de *Monascus ruber* em frascos de *Erlenmeyer* cobertos com filme colorido.

Parâmetros	Luz direta	Ama-relo	Verde	Azul	Ver-melho	Preto (ausência de luz)
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,019	0,025	0,019	0,019	0,018	0,025
$P_{\text{células}}$ (g/L.h)	0,036	0,039	0,040	0,039	0,061	0,044
Máx. biomassa (g/L)	6,94	7,60	8,44	8,62	8,82	7,40
P_M pig. vermelho (UA_{510}/h)	0,023	0,028	0,037	0,029	0,043	0,033
Máx. pig. vermelho (UA_{510})	4,48	6,17	6,17	6,25	8,32	7,17

A maior produtividade média de células e de pigmentos foi observada no frasco coberto com filme vermelho e a menor, no frasco exposto à iluminação direta. As velocidades específicas de crescimento na fase exponencial variaram de 0,018 a 0,025 h^{-1} , valores próximos aos encontrados nos ensaios realizados com os diferentes substratos.

A Figura 4.34 apresenta a evolução da formação de pigmentos, biomassa e determinação do pH no meio de cultivo para o frasco coberto com filme vermelho, que apresentou a maior formação de pigmentos.

O pH permaneceu em torno de 6,5 durante todo o cultivo e a máxima formação de pigmentos foi verificada no término da fase de crescimento. Com o aumento da formação de biomassa, houve um aumento na produção de pigmentos nos comprimentos de onda 410, 470 e 510 nm, podendo a produção de pigmentos ser considerada parcialmente associada ao crescimento.

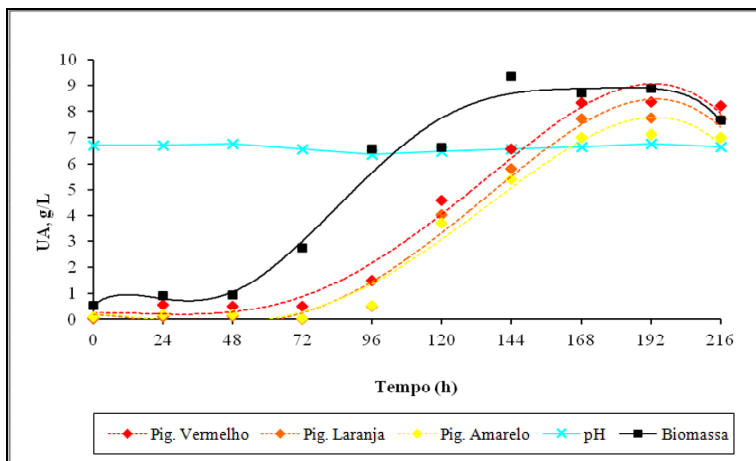


FIGURA 4.34 – Produção de pigmentos, biomassa e variação do pH em frasco coberto com filme vermelho e exposto à fonte de iluminação (lâmpada de 15 W).

Outro ensaio foi realizado com os frascos expostos à iluminância média de 2.688 lux (lâmpada de 25 W). A produção máxima de pigmentos foi determinada ao final do cultivo, que teve duração de 192 horas. A Tabela 4.13 apresenta a produtividade média de pigmentos vermelhos nos frascos cobertos com filme colorido.

TABELA 4.13 – Produtividade e produção de pigmentos vermelhos nos frascos agitados expostos à fonte de iluminação (lâmpada fluorescente compacta de 25 W).

Frasco	Produção de pig. vermelhos (UA ₅₁₀) em 192 h	Produtividade de pigmentos vermelhos em 192 h (UA ₅₁₀ /h)
Iluminação direta (sem filme)	4,53	0,018
Filme azul	5,59	0,024
Filme verde	5,01	0,020
Filme vermelho	6,46	0,027
Fime preto (ausência de luz)	6,49	0,029

Nesses ensaios observou-se maior formação de pigmentos vermelhos no frasco coberto com filme preto (ausência de luz) e no

frasco coberto com filme vermelho. A menor produção de pigmento foi observada no frasco exposto à iluminação direta, seguido do frasco coberto com filme verde. De acordo com a Figura 4.35, é possível observar diferença na intensidade da coloração das amostras retiradas dos frascos ao final do cultivo.

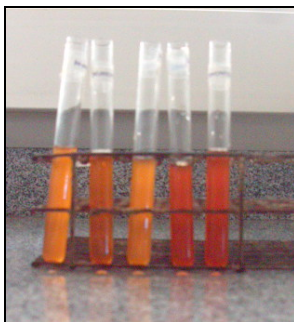


FIGURA 4.35 – Amostras do meio de cultivo de *Monascus ruber* exposto à fonte de iluminação de 25 W, conforme sequência da esquerda para a direita: iluminação direta (sem filme), filme azul, filme verde, filme vermelho e filme preto (ausência de luz).

Para Babitha et al. (2008), a incubação no escuro de *Monascus purpureus* em frascos aletados de 250 ml resultou num aumento na produção de pigmentos (aproximadamente 2 vezes) e o crescimento do fungo em iluminação direta e contínua resultou na redução da produtividade de formação de pigmentos. A produção de pigmentos no meio de cultivo aumentou com a exposição à luz vermelha, enquanto que os comprimentos de onda verde e azul inibiram a produção de pigmentos. Comportamento semelhante foi observado nos ensaios realizados.

De acordo com Velmurugan et al. (2010), ausência de iluminação, luz azul, luz vermelha e luz branca direta influenciam na produtividade de pigmentos e de biomassa em cultivos submersos de *Monascus purpureus*. Os autores verificaram que a produção extracelular e intracelular de pigmentos vermelhos é máxima quando cultivos submersos foram realizados em ausência de iluminação e houve diminuição no crescimento e na produção de pigmentos quando expostos à luz direta.

O *Monascus* responde à luz (azul, vermelha, escuro) regulando a produção de metabólitos secundários e o desenvolvimento celular. De acordo com Miyake et al. (2005), *Monascus*, *Neurospora*, *Aspergillus* e

outros fungos possuem mecanismos para a sensibilidade da luz de várias formas e esse sistema de sensibilidade à luz pode ter uma aplicação comercial importante, como a produção de pigmentos.

Uma hipótese para a maior produção de pigmentos em frascos e placas cobertos com filme vermelho é a determinação de menores valores de iluminância no interior desses frascos e placas. Devido à inibição da produção de pigmentos em situações de exposição à luz e em maiores valores de iluminância, pode não haver influência apenas do comprimento de onda na produção de pigmentos, conforme sugerido por Miyake et al. (2005), Babitha et al. (2008) e Velmurugan et al. (2010).

4.3.4.1 Estabilidade da cor à luz

Para avaliar a degradação da cor foi determinada, a cada intervalo de tempo de 12 horas, a absorbância de uma solução de pigmentos de *Monascus ruber* exposta à fonte de iluminação contínua em frasco aletado coberto com filme colorido e incubado em agitador orbital.

Realizou-se a regressão linear dos valores encontrados ($UA - UA_0$, $\ln UA/UA_0$ e $1/(UA/UA_0)$) em função do tempo para reações de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, onde UA_0 é a concentração inicial de pigmentos vermelhos. Pela análise do coeficiente de correlação (R^2) observou-se comportamento não linear e variação da cinética de degradação das soluções de pigmentos nas diferentes condições de iluminância, sendo necessários maiores estudos para obtenção das constantes de degradação e tempo de meia-vida dos pigmentos.

Carvalho et al. (2005) também observaram comportamento não linear da variação da cor de solução de pigmentos monascus em diferentes valores de temperatura e pH.

Para comparação dos resultados, foi determinada a absorbância relativa dividindo a absorbância mensurada em cada intervalo de tempo pela absorbância inicial da solução de pigmentos.

A Figura 4.36 apresenta a variação da cor (absorbância relativa) em função do tempo das soluções aquosas de pigmentos em diferentes valores de iluminância (Tabela 4.14).

Em maiores valores de iluminância (iluminação direta e filme amarelo) observou-se maior degradação dos pigmentos e maior alteração da cor da solução. Menor degradação e menor alteração da cor foram observadas na solução de pigmentos em frasco coberto com filme preto (ausência de luz) e frasco coberto com filme vermelho (menor valor de iluminância).

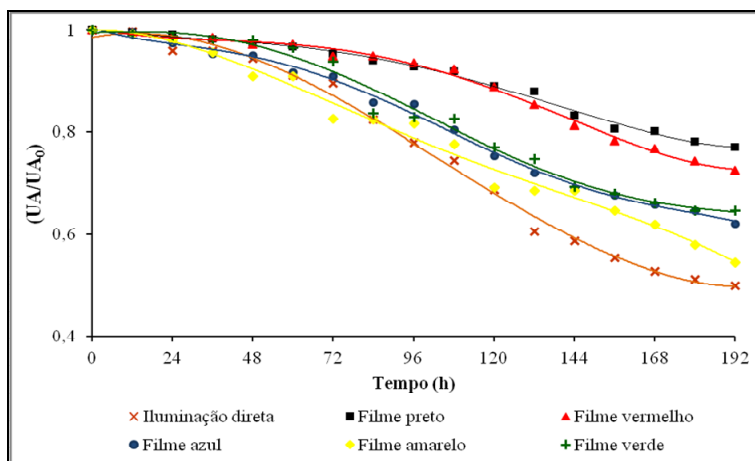


FIGURA 4.36 – Variação da cor (medida em absorvância relativa) em função do tempo (h) nos frascos expostos à fonte de iluminação e cobertos com filme colorido.

TABELA 4.14 – Valores de iluminância média (E_m) no interior dos frascos de *Erlenmeyer* cobertos com filme colorido e expostos à fonte de iluminação (lâmpada de 15 W).

Frasco de <i>Erlenmeyer</i>	Iluminância
Iluminação direta (sem filme)	1.354 ± 389
Filme preto (ausência de luz)	-
Filme vermelho	562 ± 102
Filme azul	884 ± 211
Filme amarelo	1.108 ± 448
Filme verde	862 ± 216

Jung et al. (2005) verificaram a estabilidade de pigmentos de *Monascus* submetidos a luz solar ($2,33 \pm 0,26 \text{ MJ/m}^2$) e a lâmpada UV (365 nm, 8 W). Os autores observaram cinética de degradação de primeira ordem e que os pigmentos foram mais estáveis quando expostos à lâmpada UV do que à luz solar, o que está relacionado à menor irradiação da lâmpada. Os autores observaram que os pigmentos foram mais estáveis em várias condições de pH, solvente, temperatura, iluminação e concentração inicial de pigmentos quando adicionados de diferentes aminoácidos. Para pigmento vermelho, sem adição de aminoácidos, obtiveram constante de degradação (k) de $3,2 \pm 0,105 \text{ h}^{-1}$ e

tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de $0,22 \pm 0,01$ horas para pigmentos expostos a radiação solar e constante de $0,029 \pm 0,011 \text{ h}^{-1}$ e tempo de meia-vida de $24,02 \pm 0,96$ horas, para pigmentos expostos à luz UV. Para pigmento vermelho adicionado de glicina, a constante de degradação à luz solar foi de $0,137 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ e tempo de meia-vida de $5,06 \pm 0,02$ horas e a constante de degradação em lâmpada UV foi de $0,003 \pm 0,0002 \text{ h}^{-1}$ e tempo de meia-vida de $245,36 \pm 17,72$ horas.

Lima et al. (2005) verificaram que o extrato antociânico de pitanga roxa ao abrigo da luz manteve-se mais estável do que o extrato submetido à luminosidade (lâmpada fluorescente de 80 W), mesmo comportamento observado nos ensaios realizados com os pigmentos de *Monascus*. Os autores encontraram constantes de velocidade (k) em cinética de degradação de primeira ordem de $7,3 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ para amostras na presença de luz e $5,7 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ para amostras de extrato na ausência de luz. A perda de 50% da cor original (tempo de meia-vida) ocorreu após 948,3 horas (39 dias) para o extrato submetido ao efeito da luz e após 1205,7 horas (50 dias) para o extrato ao abrigo da luz, demonstrando a maior instabilidade do extrato antociânico à luminosidade.

De acordo com Hajjaj et al. (1997), a degradação dos pigmentos é fotoquímica e não é influenciada pela presença de oxigênio dissolvido. Em soluções aquosas, o pigmento apresenta degradação contínua enquanto que em soluções de pigmento com butanol e protegidas da luz, os pigmentos permanecem estáveis por semanas.

Os resultados indicam que a degradação à luz dos pigmentos foi baixa durante os ensaios realizados em frascos agitados expostos à fonte de iluminação e cobertos com filme colorido. Como ocorre produção de pigmentos durante o cultivo em frascos, os resultados de degradação sugerem que existe influência da intensidade luminosa no crescimento e na produção de pigmentos por *Monascus ruber*.

4.4 CULTIVO EM BIORREATOR

4.4.1 Avaliação dos substratos glicerina bruta, glicerina loira e glicerina bi-distilada para o crescimento e a produção de pigmentos por *Monascus ruber*

Para avaliar os substratos glicerina bruta, glicerina loira, glicerina bi-distilada, glicerol e glicose, foram realizados ensaios em biorreator BIOFLO III, com volume útil de 4 L, para verificar a produção de pigmentos por *Monascus ruber*. As Figuras 4.37 a 4.41 apresentam a

produção de pigmentos, a produção de biomassa, o pH do meio de cultivo e o consumo de substrato nos cultivos com os diferentes substratos.

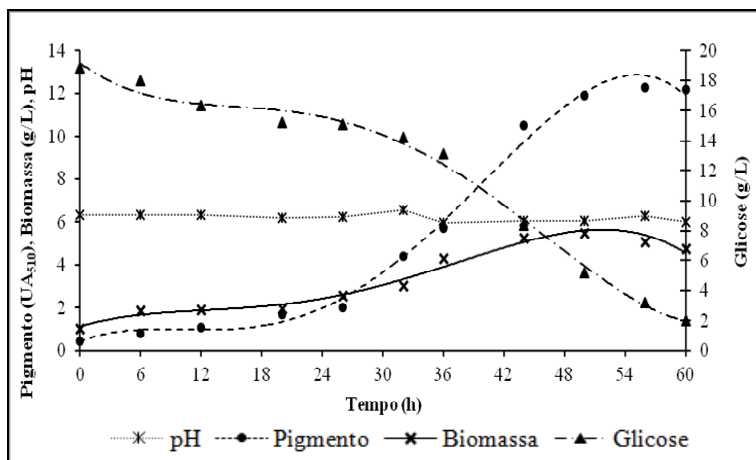


FIGURA 4.37 – Produção de biomassa e pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator contendo 20 g/L de glicose como substrato.

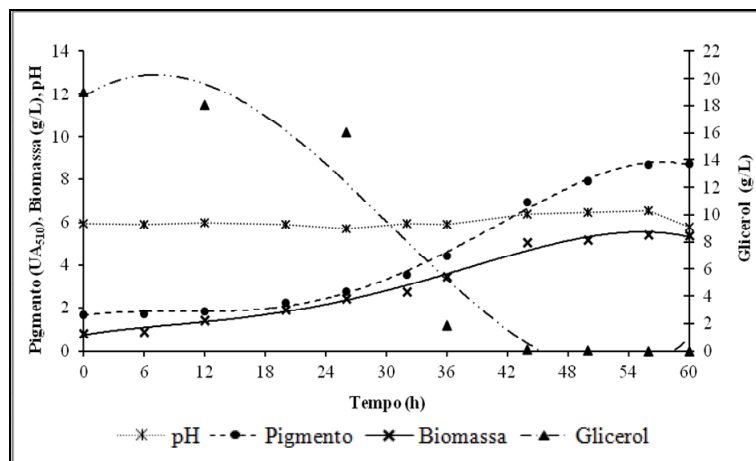


FIGURA 4.38 – Produção de biomassa e de pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator contendo 20 g/L de glicerina bruta como substrato.

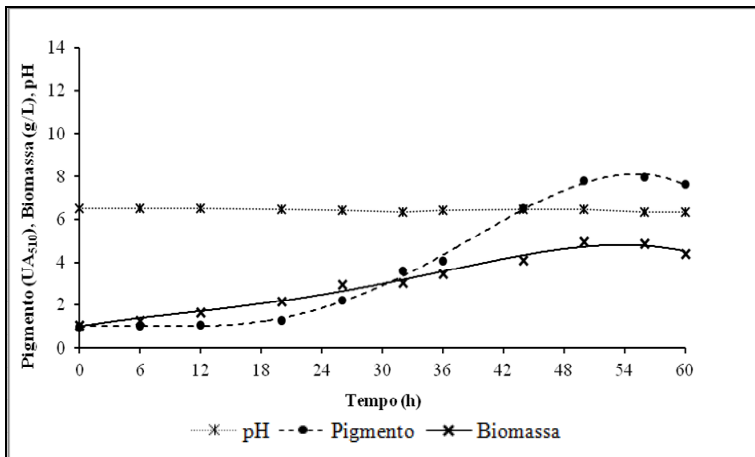


FIGURA 4.39 – Produção de biomassa e de pigmento vermelho em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator contendo 20 g/L de glicerina loira como substrato.

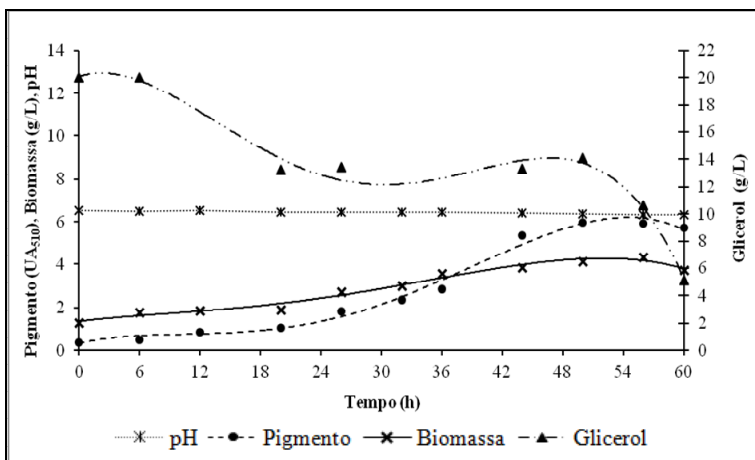


FIGURA 4.40 – Produção de biomassa e pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator contendo 20 g/L de glicerina bi-distilada como substrato.

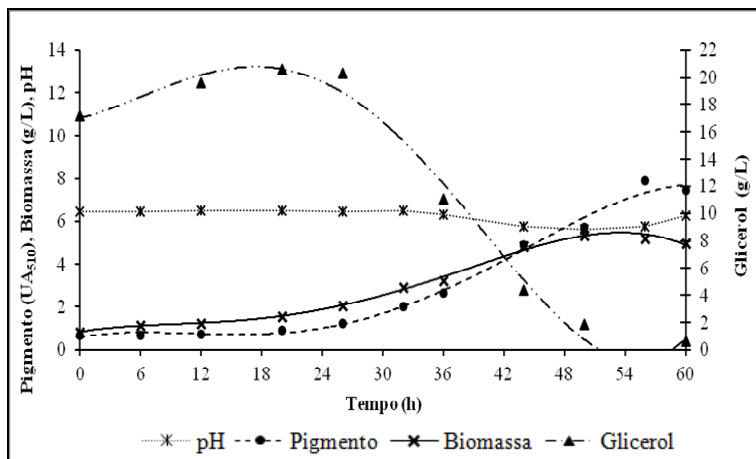


FIGURA 4.41 – Produção de biomassa e pigmento vermelho e consumo de substrato em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator contendo 20 g/L de glicerol como substrato.

Observou-se crescimento e produção de pigmentos em todos os cultivos, com maior produção de pigmentos vermelhos no cultivo realizado com glicose como única fonte de carbono (produção máxima de 11,82 UA). Nos cultivos contendo glicerol ou glicerina, a produção variou de 5,56 a 7,25 UA de pigmentos vermelhos.

Nos ensaios realizados foi possível observar uma fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo de aproximadamente 20 horas e a fase de crescimento foi observada após 26 horas de cultivo. O término do crescimento foi observado após 50 horas de cultivo para os ensaios com glicerina loira, glicerina bruta, glicose e glicerina bi-distilada e no ensaio com glicerol, a fase de crescimento finalizou em 40 horas. A concentração de biomassa variou de 3,06 g/L a 4,60 g/L.

Observou-se uma fase linear de crescimento, que ocorre em microrganismos filamentosos devido à limitação no transporte dos nutrientes e do oxigênio dissolvido no meio para o interior das células.

A produção de pigmentos vermelhos iniciou na fase de crescimento e a produção máxima de pigmentos foi observada na fase estacionária de crescimento (50 a 60 horas de cultivo), indicando que os pigmentos são metabólitos secundários. O pH do meio de cultivo permaneceu na faixa de 5,5 a 6,5 em todos os ensaios, favorecendo a liberação dos pigmentos. Os dados cinéticos determinados nos ensaios estão apresentados na Tabela 4.15 .

TABELA 4.15 – Grandezas cinéticas de cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de substrato.

	Glicose 20 g/L	Glic. bruta 20 g/L	Glic. loira 20 g/L	Glic. bi- destilada 20 g/L	Glice- rol 20 g/L
P _{células} (g/L.h)	0,090	0,085	0,078	0,054	0,081
Máx. biomassa (g/L)	4,50	4,60	3,90	3,06	4,54
P _M pig. vermelho (UA ₅₁₀ /h)	0,211	0,117	0,125	0,111	0,129
P _M pig. laranja (UA ₄₇₀ /h)	0,234	0,094	0,095	0,102	0,142
P _M pig. amarelo (UA ₄₁₀ /h)	0,261	0,147	0,088	0,099	0,142
Máx. pig. vermelho (UA ₅₁₀)	11,82	7,03	7,02	5,56	7,25
Máx. pig. laranja (UA ₄₇₀)	13,10	5,27	4,68	5,11	7,94
Máx. pig. amarelo (UA ₄₀₀)	14,60	8,21	4,42	4,94	9,45

Maiores valores de produtividade média de células e de pigmentos foram observados nos cultivos realizados com glicose, substrato mais utilizado para o cultivo de *Monascus*. A adaptação do microrganismo ao meio de cultivo foi favorecida devido ao uso de glicose para o preparo do inóculo.

Em cultivos de *Monascus purpureus* utilizando glicose como substrato em biorreator batelada de 3 L, com volume útil de 1,5 L, Lee et al. (2001) observaram produção máxima de 5,90 g/L de biomassa. A produção de pigmentos vermelhos iniciou na fase exponencial de crescimento, com produção máxima de 13,37 UA na fase estacionária. Na fase estacionária observaram diminuição da concentração de pigmentos possivelmente devido à degradação dos pigmentos por uma via enzimática induzida pela exaustão de nutrientes.

A Tabela 4.16 apresenta os fatores de conversão obtidos para os cultivos. Algumas curvas típicas estão apresentadas no Apêndice E.

O fator de conversão de substrato em biomassa variou de 0,17 a 0,22 nos cultivos com glicerina ou glicerol e no cultivo com glicose, observou-se fator de conversão de 0,24.

Os maiores fatores de conversão de substrato em pigmentos e de biomassa em pigmentos foram observados no cultivo contendo glicose,

indicando que a produção e a liberação de pigmentos foi favorecida com esse substrato. Para os outros substratos, esse fator variou de 0,30 a 0,37 para conversão de substrato em pigmentos e 1,10 a 2,13 para conversão de biomassa em pigmentos.

TABELA 4.16 – Fatores de conversão do cultivo de *Monascus ruber* em biorreator variando o substrato.

Fator de conversão	Glicose 20 g/L	Glicerina bruta 20 g/L	Glicerina bi-destilada 20g/L	Glicerol 20 g/L	Glicerina bruta 10 g/L
$Y_{X/S}$	0,24	-	-	-	-
$Y_{X/G}$	-	0,20	0,17	0,20	0,22
$Y_{P/S}$	0,81	-	-	-	-
$Y_{P/G}$	-	0,30	0,37	0,30	0,30
$Y_{P/X}$	2,94	1,60	2,13	1,36	1,10

Em cultivos de *Monascus purpureus* em biorreator Bioflo III, com volume útil de 4 L, utilizando glicose como substrato e nas condições de 30 °C de temperatura, agitação de 500 rpm, pH 5,5, tempo de cultivo de 60 horas e aeração de 1 vvm, Orozco e Kilikian (2008) obtiveram os seguintes resultados: máxima produção de biomassa de 8,1 e 9,2 g/L; 8,4 e 8,5 UA de pigmentos vermelhos e fator de conversão de biomassa em pigmentos ($Y_{P/X}$) de 1,1 e 1,0. A produção de pigmentos extracelulares foi maior em valores de pH 5,5 a 8,0, influenciando a liberação dos pigmentos também em ensaios em biorreator.

Hajjaj et al. (2000), realizaram ensaios de cultivo de *Monascus ruber* em batelada, em biorreator de 2 L com volume útil de 1,3 L utilizando meio de cultivo contendo 20 g/L de glicose, 5 g/L de glutamato monossódico e sais, agitação de 250 rpm e aeração de 0,04 vvm. Houve exaustão da glicose do meio em 120 horas de cultivo. A biomassa obtida foi de 5 g/L, correspondendo a fator de conversão de glicose em células ($Y_{X/S}$) de 0,24. Foram obtidos 5,8 UA de pigmentos vermelhos e o pH do meio de cultivo diminuiu de 6,7 para 6,1.

Lee et al. (2001) obtiveram fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) de 0,20 e velocidade específica de produção de pigmento vermelho de 32,5 UA/g.h em cultivo de *Monascus* em biorreator utilizando glicose como substrato.

Os resultados encontrados nos ensaios realizados com glicose e glicerina estão próximos aos resultados de produção de pigmentos e biomassa encontrados na literatura utilizando glicose como substrato.

Pode-se observar nos cultivos com glicerina e glicerol um aumento da concentração do substrato residual após o início da fase de crescimento. Esse aumento pode estar associado à via metabólica de oxidação do substrato para o crescimento e para a manutenção das células. Ocorre a produção de glicerol para fornecimento de energia e formação dos constituintes das células, como ácidos graxos (JUZLOVA et al., 1996).

Para verificar a influência da concentração do substrato foram realizados ensaios com diferentes concentrações de glicose e/ou glicerina bruta e os resultados estão apresentados na Tabela 4.17.

TABELA 4.17 – Grandezas cinéticas de cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando diferentes concentrações de glicerina bruta e/ou glicose.

	Glicerina bruta 10 g/L	Glicerina bruta 40 g/L	Glicerina bruta 10 g/L e glicose 10 g/L	Glicerina bruta 5 g/L e glicose 5 g/L
$P_{células}$ (g/L.h)	0,032	0,016	0,039	0,065
Máx. biomassa (g/L)	1,74	0,98	2,36	1,40
P_M pig. vermelho (UA_{510} /h)	0,081	0,024	0,128	0,073
P_M pig. laranja (UA_{470} /h)	0,078	0,045	0,086	0,081
P_M pig. amarelo (UA_{410} /h)	0,071	0,016	0,097	0,086
Máx. pig. vermelho (UA_{510})	2,91	1,42	7,69	4,09
Máx. pig. laranja (UA_{470})	2,82	2,73	6,19	4,88
Máx. pig. amarelo (UA_{400})	3,12	0,88	5,86	5,16

Observou-se menor formação de biomassa nos cultivos contendo menores concentrações de substrato. Porém, com o aumento da concentração de glicerina bruta para 40 g/L, não houve maior produção

de pigmentos e crescimento provavelmente devido ao aumento da viscosidade do meio.

De acordo com Dominguez-Espinosa e Webb (2003), na maioria dos cultivos de *Monascus*, a biomassa e a produção de pigmentos estão diretamente associados à concentração de fonte de carbono (geralmente glicose) e fonte de nitrogênio no meio de cultivo. Um menor rendimento na produção de pigmentos é observado em cultivos com baixas concentrações de fonte de carbono e fonte de nitrogênio e em altas concentrações de fonte de carbono devido ao aumento da viscosidade do meio, dificultando a sua aeração.

Lee et al. (1995) observou que em concentrações elevadas de substrato, a produtividade de células e de pigmentos diminui drasticamente, possivelmente, devido à tensão de cisalhamento criada pelo aumento da viscosidade e diminuição da concentração de oxigênio no meio.

De acordo com Lee et al. (2001), a viscosidade interfere na aeração do meio de cultivo, restringindo a quantidade de oxigênio dissolvido. Vendruscolo et al. (2009) observou que o aumento de tensão no meio de cultivo, que pode ser observado com o aumento da frequência da agitação, danifica o microrganismo.

A adição de glicose ao meio de cultivo favoreceu a produção de pigmentos, sendo uma alternativa para aumentar a viabilidade da utilização da glicerina bruta como substrato. Isso ocorreu, possivelmente, devido à morfologia do *Monascus ruber* em cultivos com glicose. Apesar de não ser observada maior formação de biomassa utilizando glicose, em relação aos outros substratos, a formação de *pellets* menores é favorecida. Ocorre uma melhor adaptação do microrganismo em cultivos contendo glicose, favorecendo a formação dos metabólitos secundários em detrimento ao crescimento.

A Tabela 4.18 apresenta as máximas velocidades específicas de crescimento, de produção de pigmentos vermelhos e de consumo de substrato determinadas nos cultivos realizados.

As máximas velocidades específicas de crescimento, na fase linear de crescimento, ocorreram no intervalo de 26 a 30 horas de cultivo nos ensaios realizados com 20 g/L de substrato. Nos ensaios realizados com 10 g/L de substrato, as máximas velocidades específicas de crescimento foram observadas em 15 horas de cultivo.

Maiores velocidades específicas de produção de pigmentos vermelhos foram observadas nos ensaios com glicose. As máximas velocidades foram obtidas em 35 horas de cultivo nos ensaios realizados

com 20 g/L de substrato e 15 horas, nos ensaios realizados com 10 g/L de substrato.

As máximas velocidades específicas de consumo de substrato foram observadas em diferentes instantes, com variação dos valores, nos ensaios realizados com os diferentes substratos.

TABELA 4.18 – Máximas velocidades específicas de crescimento (μ_x), produção de pigmentos vermelhos (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) para o cultivo de *Monascus ruber* em biorreator variando o substrato.

Substrato	μ_x (h ⁻¹)	μ_p (UA ₅₁₀ /g.h)	μ_s (g/g.h)
Glicose 20 g/L	0,042	0,117	0,104
Glicerina bruta 20 g/L	0,044	0,078	0,320
Glicerina loira 20 g/L	0,032	0,074	-
Glicerina bi-destillada 20 g/L	0,028	0,061	0,244
Glicerol 20 g/L	0,052	0,062	0,588
Glicerina bruta 10 g/L	0,042	0,077	0,068
Glicerina bruta 40 g/L	0,025	0,011	
Glicose 5 g/L e glicerina bruta 5 g/L	0,061	0,078	-
Glicose 10 g/L e glicerina bruta 10 g/L	0,057	0,095	-

Hamdi et al. (1996) utilizaram suco de pêra como substrato para cultivo de *Monascus purpureus* em biorreator batelada de 2 L. Em condições de controle de oxigênio obtiveram velocidade específica de crescimento de 0,05 h⁻¹, máxima velocidade específica de pigmento vermelho de 0,2 UA₄₈₀/g.h e máxima velocidade específica de consumo de glicose de 0,45 g/g.h.

Foram obtidos os seguintes valores por Hajjaj et al. (2000) para os parâmetros cinéticos: $\mu_{m\acute{a}x}$, 0,04 h⁻¹; velocidade específica de produção de pigmento vermelho, 1,52 mg/g.h (0,078 UA/g.h) e velocidade específica de consumo de glicose 0,15 g/g.h.

Em cultivos de *Monascus ruber* em fermentador batelada de 20 L, contendo 20 g/L de glicose como substrato e glutamato monossódico como fonte de nitrogênio, Pastrana et al. (1995), observaram que não existe produção de pigmentos após a fase de crescimento. Houve produção máxima de pigmentos de 7,9 UA, com produção de 16 g/L de biomassa e o pH do meio permaneceu constante, em torno de 6,2. A velocidade específica máxima de crescimento

encontrada foi de $0,04 \text{ h}^{-1}$, velocidade máxima de produção de pigmento vermelho de aproximadamente $0,08 \text{ UA/g.h}$ e velocidade específica de consumo de substrato de $0,18 \text{ g/g.h}$.

Para cultivos de várias cepas de *Monascus purpureus*, Kongruang (2011) obteve fator de conversão de substrato em células de $0,07$ a $0,67 \text{ g/g}$, velocidade específica de produção de pigmento vermelho de $0,011$ a $0,473 \text{ UA/d}$ e produtividade de pigmento vermelho variando de $6,37$ a $66,28 \text{ UA/g/d}$.

Em cultivos de *Monascus purpureus* com 15 g/L de glicose em biorreator de 2L , com volume útil de $1,5 \text{ L}$, Hamdi et al. (1997) obtiveram os seguintes resultados: biomassa de 4 g/L e velocidade específica de consumo de substrato de $0,1$ a $0,3 \text{ g/g.h}$. A formação de pigmentos iniciou após 50 horas de cultivo e alcançou $8,5 \text{ UA}$, sendo encontrada velocidade específica de produção de pigmentos de $0,1 \text{ UA/g.h}$. O fator de conversão de substrato em biomassa foi $0,15 \text{ g/g}$.

Em cultivo em biorreator utilizando etanol como único substrato Hamdi et al. (1997) encontraram os seguintes resultados: 5 g/L de biomassa, máxima formação de $7,8 \text{ UA}$ de pigmento vermelho e velocidade específica de produção de pigmento vermelho de $0,05 \text{ UA/g.h}$. A velocidade específica de crescimento variou de $0,01$ a $0,06 \text{ h}^{-1}$ e a velocidade específica de consumo de etanol encontrada foi de $0,2 \text{ g/g.h}$ nas primeiras 50 horas de cultivo e $0,1 \text{ g/g.h}$ durante a produção de pigmentos. O fator de conversão de substrato em biomassa encontrado foi de $0,3 \text{ g/g}$ e o consumo de substrato, formação de pigmentos e de biomassa foram associados.

A produção de biomassa e de pigmentos, os valores de fator de conversão e as velocidades específicas de produção de pigmentos, crescimento e consumo de substrato estão próximos aos encontradas na literatura, em ensaios em biorreator. Verifica-se que os melhores resultados foram obtidos no ensaio com glicose, porém, o uso de substratos, como a glicerina bruta, é uma alternativa promissora. Através dos parâmetros cinéticos obtidos pode-se investir em pesquisas para o aumento da escala e a otimização da produção de pigmentos.

Para a classificação dos processos fermentativos e a verificação da dependência da produção de pigmentos em relação ao crescimento, os valores de μ_x , μ_p e μ_s foram plotados em relação ao tempo. As Figuras 4.42 a 4.47 apresentam as curvas obtidas de alguns cultivos realizados.

As curvas apresentam um perfil parabólico. Verifica-se um aumento das velocidades específicas após 12 horas de cultivo, até atingir um valor máximo, e diminuição das velocidades no final do cultivo.

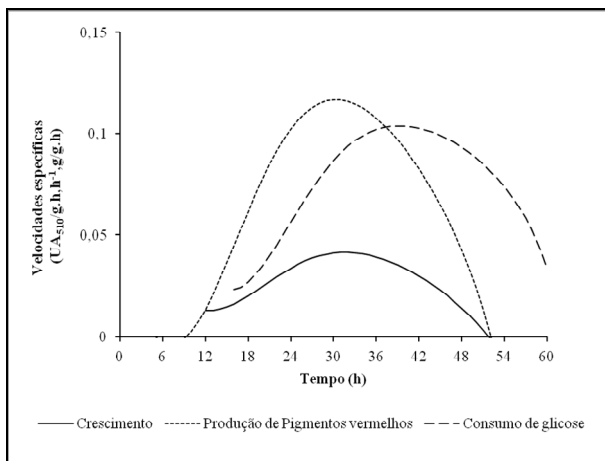


FIGURA 4.42 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de *Monascus ruber* realizado com 20 g/L de glicose como substrato.

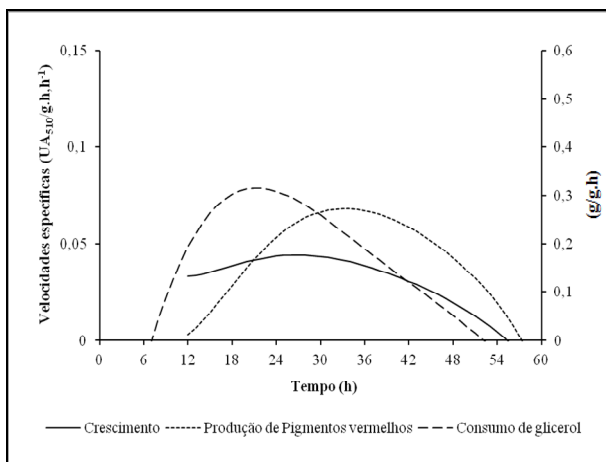


FIGURA 4.43 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de *Monascus ruber* realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato.

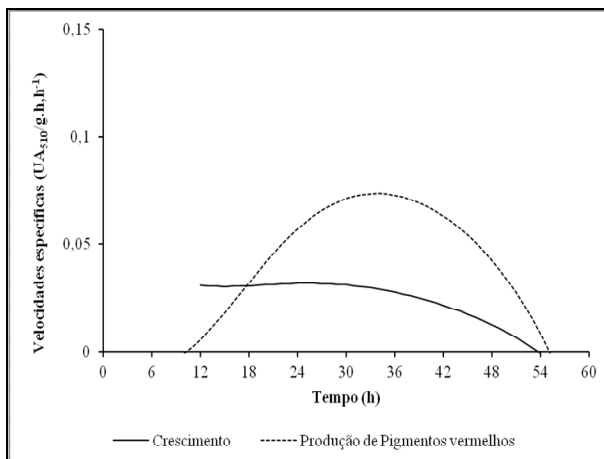


FIGURA 4.44 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de *Monascus ruber* realizado com 20 g/L de glicerina loira como substrato.

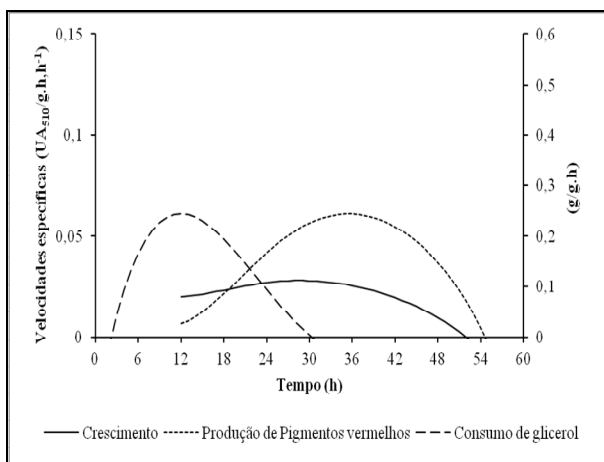


FIGURA 4.45 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de *Monascus ruber* realizado com 20 g/L de glicerina bi-destilada como substrato.

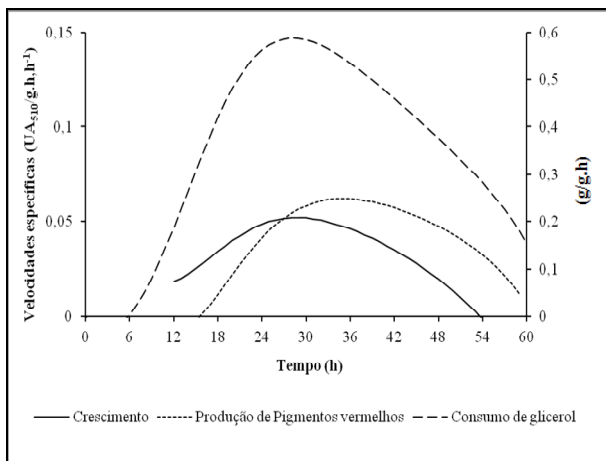


FIGURA 4.46 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de *Monascus ruber* realizado com 20 g/L de glicerol sintético como substrato.

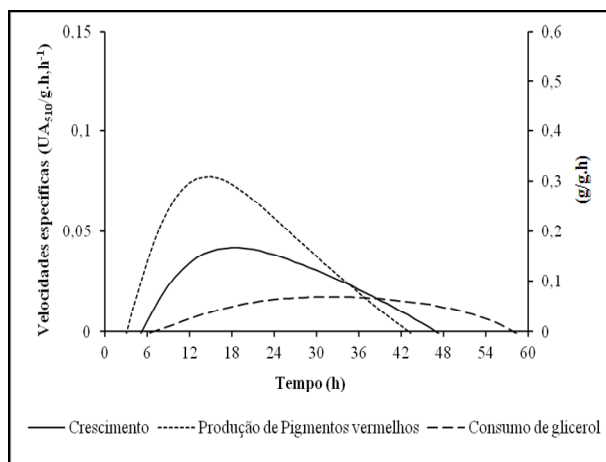


FIGURA 4.47 – Velocidades específicas em função do tempo para o cultivo de *Monascus ruber* realizado com 10 g/L de glicerina bruta como substrato.

Nas figuras verifica-se semelhança entre as curvas de μ_x e μ_p , identificando comportamento de produção de pigmentos parcialmente

associada ao crescimento celular. Vendruscolo (2009) verificou em cultivos de *Monascus ruber* em biorreator utilizando glicose como substrato, que a curva da velocidade específica de produção de pigmentos tende a se aproximar da produção associada ao crescimento celular. Obteve máxima velocidade específica de crescimento de $0,10 \text{ h}^{-1}$ e máxima velocidade específica de produção de pigmentos de $0,09 \text{ UA/g.h}$.

As maiores velocidades de produção de pigmentos foram observadas após o crescimento máximo, indicando que os pigmentos são um metabólito secundário. A produção de pigmentos após o crescimento do microrganismo indica que os pigmentos de *Monascus* são metabólitos secundários (HU, Z. et al., 2012).

Em condições de limitação de oxigênio, Hajjaj et al., (2000), verificaram que a produção de pigmentos vermelhos está associada ao crescimento.

Pastrana et al., (1995), em ensaios em biorreator e glicose como substrato, observaram que os pigmentos não foram produzidos após a fase de crescimento. A velocidade específica de produção de pigmentos foi máxima e constante na primeira fase do cultivo e uma diminuição foi observada quando a velocidade específica de crescimento atingiu seu valor máximo. Comportamento semelhante foi observado no cultivo realizado com 10 g/L de glicerina bruta.

As curvas de velocidade específica de consumo de substrato nos cultivos realizados apresentaram semelhança com as curvas de crescimento e produção de pigmentos, estando correlacionadas.

Para verificar a dependência das respostas nos cultivos de *Monascus ruber*, os valores de velocidade específica de produção de pigmentos vermelhos (μ_p) foram plotados em relação aos valores de velocidade específica de crescimento (μ_x), para obtenção dos parâmetros θ e β , através da equação apresentada por Luedeking e Piret (1959).

$$\mu_p = \theta \cdot \mu_x + \beta \quad (4.1)$$

Em que:

θ : constante empírica que descreve a dependência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular;

β : constante empírica que descreve a não dependência da produção de pigmentos associada ao crescimento celular.

Através das diferenças entre as constantes θ e β e Figuras 4.48 a 4.55, verifica-se que a produção de pigmentos pode ser classificada como parcialmente associada ao crescimento celular.

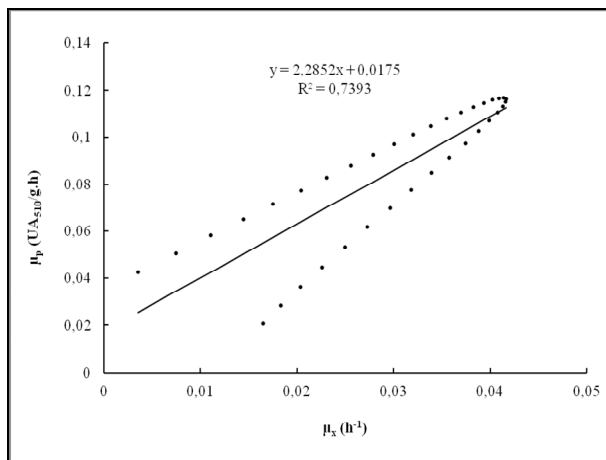


FIGURA 4.48 - μ_p X μ_x de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicose.

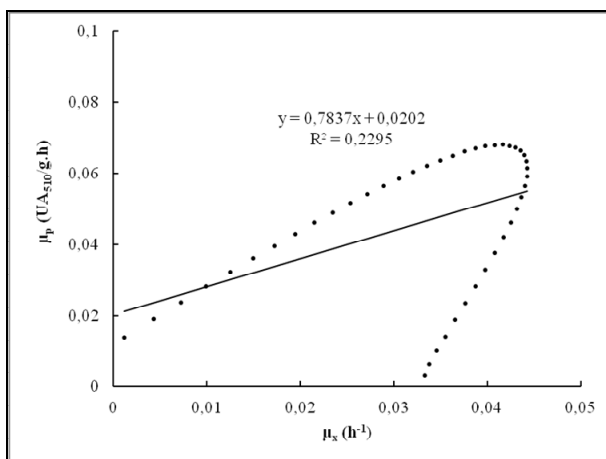


FIGURA 4.49 - μ_p X μ_x de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta.

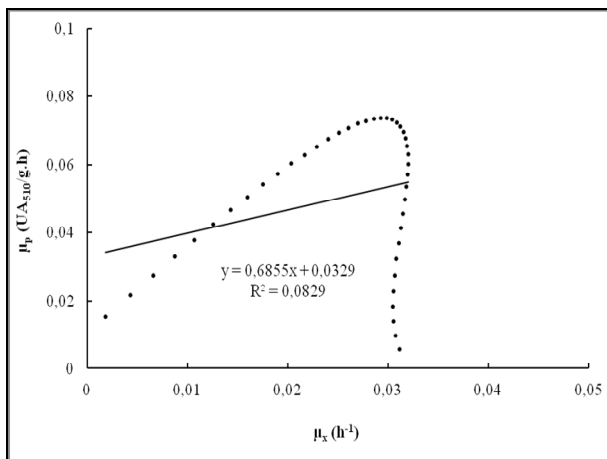


FIGURA 4.50 – μ_p X μ_x de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina loira.

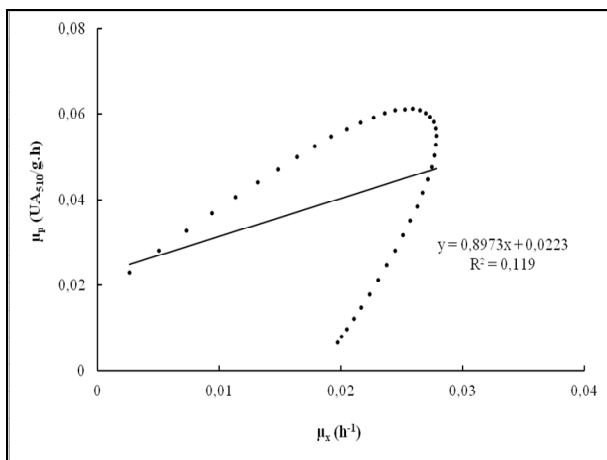


FIGURA 4.51 – μ_p X μ_x de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bi-distilada.

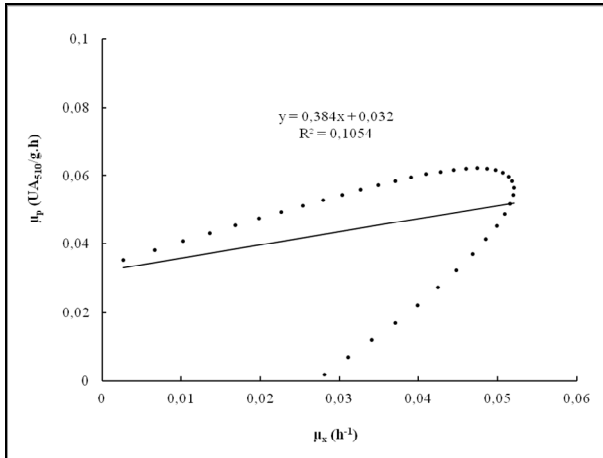


FIGURA 4.52 – μ_p X μ_x de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicerol.

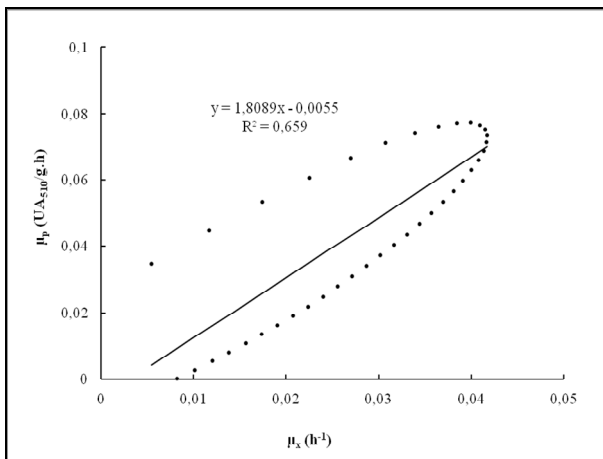


FIGURA 4.53 – μ_p X μ_x de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 10 g/L de glicerina bruta.

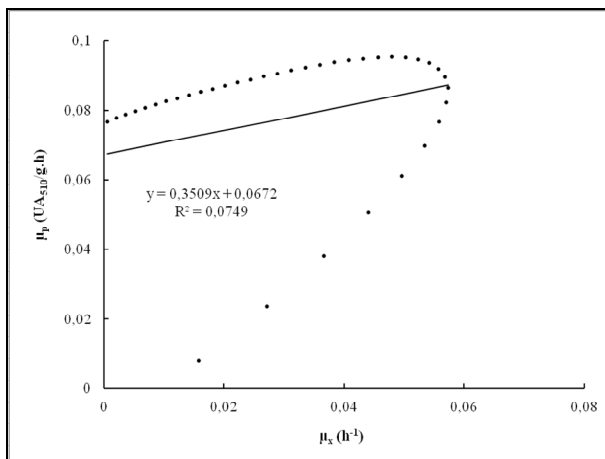


FIGURA 4.54 – μ_p X μ_x da produção de pigmento vermelho por *Monascus ruber* em biorreator utilizando 10 g/L de glicerina bruta e 10 g/L de glicose.

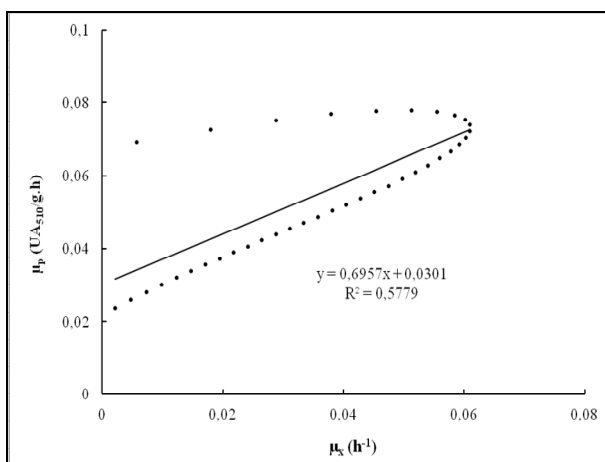


FIGURA 4.55 – μ_p X μ_x da produção de pigmento vermelho por *Monascus ruber* em biorreator utilizando 5 g/L de glicerina bruta e 5 g/L de glicose.

4.4.2 Influência da intensidade luminosa na produção de pigmentos e no crescimento de *Monascur ruber*

Para avaliar a influência da intensidade luminosa e do comprimento de onda no crescimento e na produção de pigmentos em biorreator foram realizados ensaios em biorreator Bioflo III com volume útil de 4 L. O meio de cultivo foi exposto à fonte de iluminação fixada no interior do biorreator. A iluminação foi contínua, durante todo o cultivo. O meio foi composto de glicerina bruta (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais, e o pH inicial foi ajustado para 6,5. A temperatura do cultivo permaneceu em 30 °C, com frequência de agitação de 350 rpm e aeração de 1 vvm.

A Figura 4.56 apresenta os ensaios em biorreator e meio de cultivo exposto à fonte de iluminação. A iluminância média no interior do biorreator foi determinada em cada situação (Tabela 4.19).

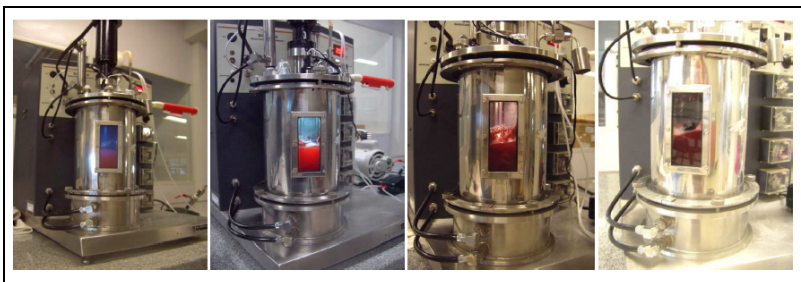


FIGURA 4.56 – Meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação em biorreator. Da esquerda para a direita: luz azul, luz branca (direta), luz vermelha e ausência de luz.

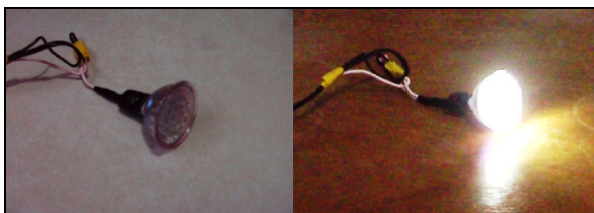


FIGURA 4.57 – Fonte de iluminação para ensaios em biorreator.

TABELA 4.19 – Iluminância média (E_m) determinada na superfície do meio de cultivo, no interior do biorreator.

Luz	Faixa de comprimento de onda (nm)	Iluminância média E_m (lux)
Branca (direta)	380 - 780	1.218 ± 212
Vermelha	622 - 760	468 ± 107
Azul	455 - 492	630 ± 256

As Figuras 4.58 a 4.60 apresentam a produção de biomassa, a produção de pigmentos e a determinação do pH do meio nos cultivos expostos à luz com diferentes comprimentos de onda e iluminância.

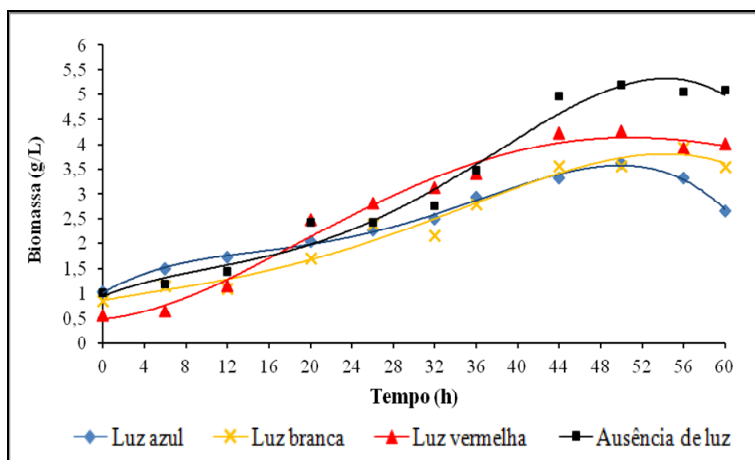


FIGURA 4.58 – Produção de biomassa em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.

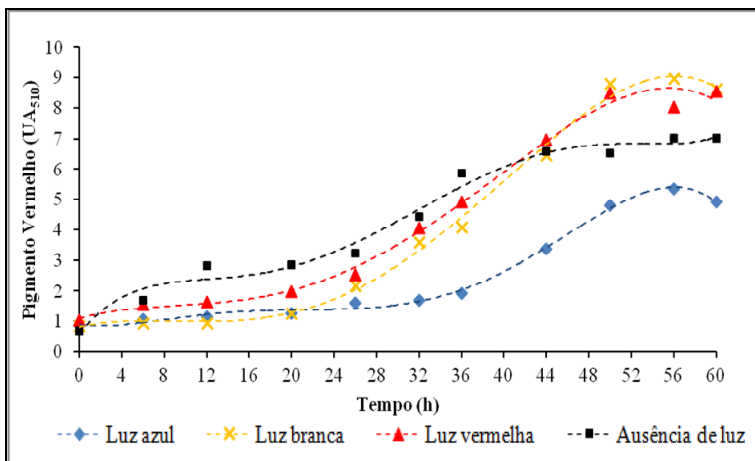


FIGURA 4.59 – Produção de pigmento vermelho em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.

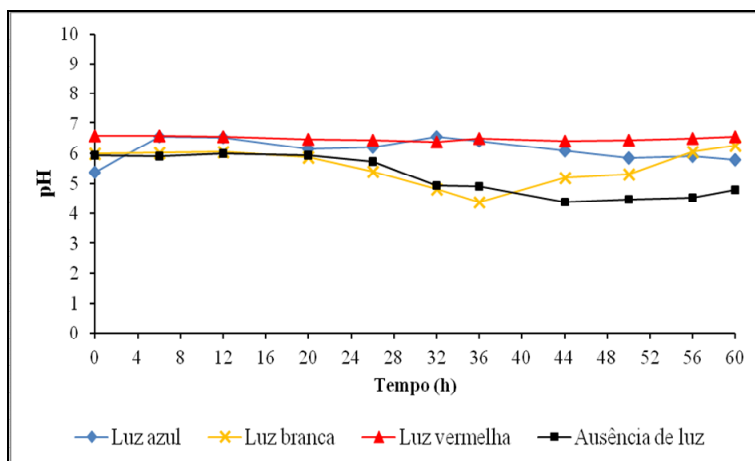


FIGURA 4.60 – Variação do pH em cultivo de *Monascus ruber* em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.

Ao contrário do observado nos frascos agitados, não verificou-se inibição do crescimento e da produção de pigmentos quando o meio de cultivo foi exposto à luz direta (branca). Foi observada grande formação de pigmento vermelho (6,34 a 8,12 UA) nos cultivos expostos à luz

vermelha, luz branca e ausência de luz. Para a luz azul foi observada formação máxima de 4,51 UA de pigmento vermelho. Verificou-se crescimento e formação de biomassa em todos os ensaios e o pH do meio de cultivo permaneceu na faixa de 5,5 a 6,5, ideal para o crescimento e a liberação de pigmentos no meio de cultivo. A Tabela 4.20 apresenta os dados cinéticos determinados para os ensaios em biorreator.

TABELA 4.20 – Grandezas cinéticas de cultivo de *Monascus ruber* em ensaios com biorreator submetidos a distintas condições de iluminação.

Parâmetros	Ausência de luz	Luz branca (direta)	Luz vermelha	Luz azul
$P_{\text{células}}$ (g/L.h)	0,084	0,055	0,074	0,052
Máx. produção de biomassa (g/L)	5,20	3,94	4,26	3,63
P_M pig. vermelho (UA ₅₁₀ /h)	0,113	0,145	0,125	0,081
P_M pig. laranja (UA ₄₇₀ /h)	0,112	0,161	0,130	0,090
P_M pig. amarelo (UA ₄₀₀ /h)	0,147	0,150	0,170	0,109
Máx. pig. vermelho (UA ₅₁₀)	6,34	8,12	7,52	4,51
Máx. pig. laranja (UA ₄₇₀)	6,27	9,04	7,83	5,06
Máx. pig. amarelo (UA ₄₀₀)	8,21	8,38	8,48	6,11

Os valores de biomassa, produção de pigmentos e produtividade média de células e de pigmentos estão próximos aos encontrados nos ensaios realizados com os resíduos (glicerinas bruta, loira e bi-destilada) em ensaios em biorreator sem influência da luz.

As curvas de velocidade específica de crescimento e de velocidade específica de produção de pigmentos determinadas para os cultivos estão apresentadas nas Figuras 4.61 e 4.62.

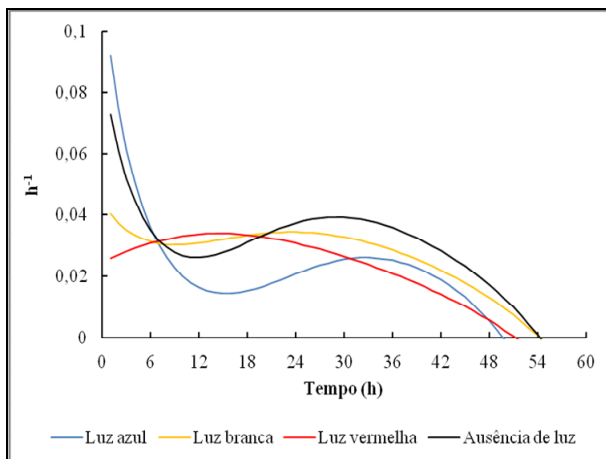


FIGURA 4.61 – Velocidades específicas de crescimento de *Monascus ruber* em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.

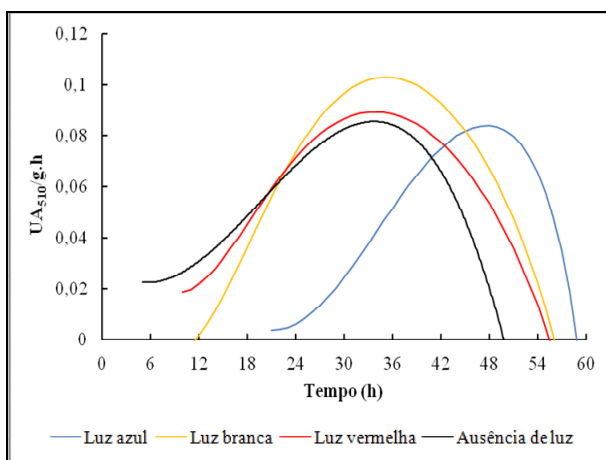


FIGURA 4.62 – Velocidades específicas de produção de pigmento vermelho por *Monascus ruber* em biorreator com meio de cultivo exposto a diferentes condições de iluminação.

Na fase linear de crescimento, a máxima velocidade específica de crescimento determinada foi de $0,034 \text{ h}^{-1}$ para os cultivos expostos à luz

vermelha e à luz branca (iluminação direta), $0,039 \text{ h}^{-1}$ para o cultivo na ausência de luz e $0,026 \text{ h}^{-1}$ para o cultivo exposto à luz azul.

A maior velocidade específica de produção de pigmentos vermelhos foi observada no cultivo exposto à luz branca ($0,103 \text{ UA}_{510}/\text{g.h}$). Nos demais cultivos, as máximas velocidades específicas de produção de pigmentos vermelhos variaram de $0,081$ a $0,084 \text{ UA}_{510}/\text{g.h}$.

As máximas velocidades específicas de produção de pigmentos vermelhos foram observadas após as máximas velocidades específicas de crescimento, estando a produção de pigmentos parcialmente associada ao crescimento.

Não verificou-se influência da luz no crescimento e na produção de pigmentos nesses ensaios devido, provavelmente, à limitada superfície exposta à condição de iluminação. A luz não atravessou o meio de cultivo viscoso, não ocorrendo a ativação dos fotorreceptores em todas as células, apesar da agitação do meio de cultivo. Para verificar a influência em volumes maiores, sugere-se a utilização de biorreator conforme descrito por Jacob-Lopes et al. (2008). Os autores estudaram a influência da luz na produção de biomassa e fixação de dióxido de carbono pela cianobactéria *Aphanothece microscópica Nägeli* em um fotobiorreator construído em vidro de 4,0 mm e disposto em uma câmara iluminada com lâmpadas para obter a intensidade luminosa desejada.

Assim, mais estudos são necessários em cultivos de *Monascus ruber* com aumento de escala. É conhecido que a luz é um sinal muito importante para os fungos, pois influencia nas diferentes respostas fisiológicas, como pigmentação, desenvolvimento sexuado, conidiação assexuada e a produção de metabólitos secundários.

5 CONCLUSÕES

Apesar da diferença na composição dos substratos, observou-se, através da determinação da velocidade de crescimento radial, crescimento e pigmentação em placas de Petri inoculadas com *Monascus ruber* em meio de cultivo contendo glicerina bruta, loira, bi-distilada, glicerol e glicose. A velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* variou de 1,83 a 2,02 mm/dia, não sendo observada diferença significativa entre as amostras.

Em frascos de *Erlenmeyer* aletados e incubados em agitador orbital observou-se crescimento e produção de pigmentos em cultivos de *Monascus ruber* utilizando glicerina como substrato. A máxima produção de pigmento vermelho foi observada nos frascos contendo glicose, e nos frascos contendo glicerina observou-se produção de pigmentos vermelhos variando de 6,31 a 9,14 UA. A produção de pigmento vermelho foi favorecida em meio de cultivo contendo glicina ou glutamato monossódico como fonte de nitrogênio e com pH inicial variando de 5,5 a 8,5.

Em ensaios em biorreator utilizando glicose, glicerol, glicerina bruta, loira e bi-distilada obteve-se em torno de 4 g/L de biomassa. A maior produção de pigmentos foi observada no cultivo realizado com 20 g/L de glicose (11,82 UA). Nos cultivos contendo 20 g/L de glicerina bruta, 20 g/L de glicerina bi-distilada, 20 g/L de glicerina loira e 10 g/L de glicerina bruta e 10 g/L de glicose, a produção máxima de pigmento vermelho variou de 5,56 a 7,03 UA. O aumento da concentração de glicerina bruta inibiu o desenvolvimento das células em biorreator.

Através das curvas de velocidades específicas de produção de pigmentos, produção de biomassa e consumo de substrato em biorreator, observou-se que a produção de pigmentos está parcialmente associada ao crescimento celular, com maior produção de pigmentos na fase estacionária de crescimento, indicando que os pigmentos são metabólitos secundários.

Os estudos do efeito da intensidade luminosa revelaram que a incubação em total escuridão foi mais efetiva na indução de produção de pigmentos, não sendo observado crescimento em placas expostas diretamente à luz. Maiores velocidades de crescimento radial e pigmentação foram observadas em placas expostas à fonte de iluminação e cobertas com filme vermelho (1,40 mm/dia) e filme preto (1,50 mm/dia). Em placas expostas à iluminação direta (sem filme) observou-se velocidade de crescimento radial de 0,59 mm/dia e desenvolvimento de colônias sem pigmentação.

Em ensaios em frascos agitados observou-se maior crescimento e maior produção de pigmentos em frascos mantidos na ausência de luz (7,40 g/L de biomassa e 7,17 UA de pigmento vermelho) e cobertos com filme vermelho (8,82 g/L de biomassa e 8,32 UA de pigmento vermelho). Em frascos sem filme, expostos à iluminação direta, obteve-se máxima produção de 6,94 g/L de biomassa e 4,48 UA de pigmento vermelho, o que postula a existência de fotorreceptores que apresentam resposta à escuridão e iluminação, influenciando no metabolismo dos fungos.

A influência da intensidade luminosa foi estudada através da determinação da iluminância média nas placas e frascos cobertos com filme colorido. No interior dos frascos cobertos com filme colorido, o valor de iluminância é menor, o que favoreceu o desenvolvimento do microrganismo, sendo observada menor degradação dos pigmentos em menores valores de iluminância.

A luz não influenciou a produção de pigmentos e o crescimento em biorreator, em que apenas a superfície do meio de cultivo foi exposta à fonte de iluminação.

Assim, através dos ensaios realizados, conclui-se que é possível obter produtos de maior valor agregado, como os pigmentos de *Monascus*, utilizando o co-produto do biodiesel (glicerina bruta, loira e bi-destilada) como substrato.

A glicerina bruta, sem tratamento prévio, pode ser considerada um substrato alternativo e viável para a produção de pigmentos por *Monascus ruber* em cultivo submerso, existindo influência dos fatores como pH, concentração de substrato, fonte de nitrogênio e iluminação.

REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6 n. 1, p. 71-78, 2011.
- ADRIO, J. L. e DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **Internacional Microbiology**, v. 6, p. 191-199, 2003.
- AHN, J.; JUNG, J.; HYUNG, W.; HAAM, S.; SHIN, C. Enhancement of monascus pigment production by the culture of *Monascus* spp. J101 at low temperature. **Biotechnology Progress**, v. 22, p.338-340, 2006.
- AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; UKIYA, M.; KIYOTA, A.; SAKAMOTO, N.; SUZUKI, T.; TANABE, N.; NISHINO, H. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus* - fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 562-565, 2005.
- AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.
- ANDRÉ, A.; DIAMANTOPOULOS, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 407-416, 2010.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Acessado em 09 de novembro de 2012 sob o endereço: www.anp.gov.br.
- BABITHA, S.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 2671 – 2675, 2008.

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Jackfruit Seed – a novel substrate for the production of monascus pigments through solid-state fermentation. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n.4, p. 465–471, 2006.

BARANOVA, M.; MALA, P.; BURDOVÁ, O.; HADBAVNÝ, M.; SABOLOVÁ, G. Effect of natural pigment of *Monascus purpureus* on the organoleptic characters of processed cheese. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pullawy**, n. 48, p. 59-62, 2004.

BARBIRATO, F.; HIMMI, E. H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, v.7, p.281-289, 1998.

BLANC, P. J.; LAUSSAC, J.; LE BARS, P.; LORET, M. O.; PAREILLEUX, D.; PROMÉ, J. C.; SANTERRE, A. L.; GOMA, G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 201-213, 1995.

BLANC, P. J.; HAJJAJ, H.; LORER, M. O.; GOMA, G. Control of the production of citrinin by *Monascus*. **Scientific Statements and Findings – Meetings/Symposia**. Toulouse, France. July, 1998.

BOO, H-O.; HWANG, S-J.; BAE, C-S.; PARK, S-H.; HEO, B-G.; GORINSTEIN, S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p.129– 135, 2012.

BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B.; HILTON, G. New heterogeneous process for biodiesel production: a way to improve the quality and the value of the crude glycerine produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, v. 106, n. 1-4, p. 190-192, 2005.

BRUTTEL, P. e SCHLINK, R. **Water determination by Karl Fisher titration**, 2006.

CARDOSO, L. A. C.; **Identification de facteurs opératoires influents em vie d'une production microbienne optimale de torularhodine et de as fonctionnalisation enzymatique, à partir d'études cinétiques.**

Thèse (Docteur Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environment) - Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 2008.

CARELS, M. e SHEPHERD, D. Sexual reproductive cycle of *Monascus* in submerged shaken culture. **Journal of Bacteriology**, vol. 122, n. 1, p. 288 – 294, 1975.

CARROCHANO, L. M.; LAUTER, F.; EBBOLE, D. J.; YANOFSKY, C. Light and developmental regulation of the gene com-10 of *Neurospora crassa*. **Developmental Biology** v. 167, p. 190-200, 1995.

CARVALHO, J. C.; OISHI, B. O.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Biopigments from *Monascus*: strain selection, citrinin production and color stability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.6, p. 885-894, 2005.

CHAMBERGO ALCALDE, F. S. **Elucidación do destino metabólico de glicose no fungo filamentoso *Trichoderma reesei* por análise EST (Expressed Sequences Tags) e “microarrays” de cDNA.** Tese (doutorado) em Ciências: Bioquímica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CHAN, Y.; HUANG, J.; LEE, C.; SHIH, I.; TZENG, Y. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p. 889-894, 2002.

CHANGLING, L.; ZHU, Y.; WANG, Y.; ZHU, J-S.; CHANG, J.; KRITCHEVSKY, D. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. **Nutrition Research**, v. 18, n.1, p.71-81, 1998.

CHATTOPADHYAY, P.; CHATTERJEE, S.; SEN, S. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n.17, p. 2972-2985, 2008.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAYROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

CHENG, M-J.; WU, M-D.; CHEN, I-S.; TSENG, M.; YUAN, G-F. Chemical constituents from the fungus *Monascus purpureus* and their antifungal activity. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 372-376, 2011.

CHENG, M-J.; WU, M-D.; SU, Y-S.; CHEN, I-S.; YUAN, G-F. Anti-inflammatory compounds from *Monascus pilosus*-fermented rice. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n.1, p. 63-67, 2012.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S.; A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537–1545, 2007.

CHOE, D.; LEE, J.; WOO, S.; SHIN, C. Evaluation of the amine derivatives of *Monascus* pigment with anti-obesity activities. **Food Chemistry**, v. 134, n.1, p. 315-323, 2012.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

D-ANJOU, M. e DAUGULIS, A. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 341-346, 2000.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 329 – 335, 2004.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 94, 821-829, 2006.

DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, R. M. e WEBB, C. Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 329-336, 2003.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 313-321, 2006.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 389-406, 2005.

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*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 356–361, 2009.

ERDOGRUL, O. e AZIRAK, S. Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 37-49, 2004.

ETHIER, S.; WOISARD, K.; VAUGHAN, D.; WEN, Z. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 88–93, 2011.

EVANS, P. J. e WANG, H. Y. Pigment production from immobilized *Monascus* spp. utilizing polymeric resin adsorption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1323-1326, 1984.

FABRE, C. E.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O.; BABERIAN, R.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Production and food application of the red pigments of *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 5, p. 1099-1110, 1993.

FANELLI, F.; SCHMIDT-HEYDT, M.; HAIDUKOWSKI, M.; GEISEN, R.; LOGRIECO, A.; MULE, G. Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM1 gene expression by *Fusarium proliferatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 148–153, 2012.

FERREIRA, M. O. **Purificação da glicerina bruta obtida a partir da transesterificação do óleo de algodão**. Dissertação (Mestrado) em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2009.

GABIATTI JUNIOR, 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 bioremediation. **Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal**, v. 47, n. 5, p. 225 – 232, 2004.

GALAN, M-I.; BONET, J.; SIRE, R.; RENEAUME, J-M.; PLESU, A. E. From residual to useful oil: Revalorization of glycerine from the biodiesel synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3775–3778, 2009.

GOMES, M. C. S.; ARROYO, P. A.; PEREIRA, N. C. P. Biodiesel production from degummed soybean oil and glycerol removal using ceramic membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 378, p. 453–461, 2011.

GRAUSLUND, M.; LOPES, J. M.; RONNOW, B. Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 15, p. 4391-4398, 1999.

GUERRA, R. L. H. **Glicerina bruta na alimentação de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado) em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, 2010.

HÄGGBLUM, P. e NIEHAUS, W. G. Light effects on polyketide metabolism in *Alternaria alternata*. **Experimental Mycology**, v.10, p. 252-255, 1986.

- HÄGGBLUM, P. e NIEHAUS, W. G. The effect of different wavelenghts of light on polyketide metabolism in *Alternaria alternata*. **Experimental Mycology**, v. 11, p. 150-153, 1987.
- HAJJAJ, H.; KLAÉBÉ, A.; LORET, M. O.; TZÉDAKIS, T.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Production and identification of N-glucosylrubropunctamine and N-glucosylmonascubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.7, p. 2671-2678, 1997.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GROUSSAC, E.; GOMA, G.; URIBELARREA; LOUBIERE, P. Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 64, n.4, p. 497- 501, 1999.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetics analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme Microbial Technology**, v.27, p. 619-625, 2000.
- HALLIDAY, D.; RESNICK, R. **Física II**. LTC – Livros técnicos e científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 1ª Edição, 1973.
- HAMANO, P. S. e KILIKIAN, B. V. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.
- HAMANO, P. S.; OROZCO, S. F. B. M.; KILIKIAN, B. V. Concentration determination of extracellular and intracellular red pigments produced by *Monascus* spp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48. p. 43-49, 2005.
- HAMDI, M.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Effect of aeration conditions on the production of red pigments by *Monascus purpureus* growth on prickly pear juice. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6; p. 543-547, 1996.

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**, v. 17, p. 75–79, 1997.

HU, S.; LUO, X.; WAN, C.; LI, Y. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60, p. 5915-5921, 2012.

HU, Z.; ZHANG, X.; WU, Z.; QI, H.; WANG, Z. Export of intracellular *Monascus* pigments by two-stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous. **Journal of Biotechnology**, n. 162, p. 202-209, 2012.

IDNURM, A. e HEITMAN, J. Photosensing Fungi: phytochrome in the spotlight. **Current Biology**, v. 15, n. 20, 2005.

IMANDI, S. B.; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; GARAPATI, H. R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1367 – 1372, 2007.

ISAHAK, W. N. R. W.; ISMAIL, M.; YARMO, M. A.; JAHIM, J. M.; SALIMON, J. Purification of crude glycerol from transesterification RBD palm oil over homogeneous and heterogeneous catalysts for the biolubricant preparation. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 21, 2590-2595, 2010.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nägeli* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 27–34, 2008.

JAVANI, A.; HASHEMINEJAD, M.; TAHVILDARI, K.; TABATABAEI, M. High quality potassium phosphate production through step-by-step glycerol purification: A strategy to economize biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 788–790, 2012.

JIA, X.; XU, Z.; ZHOU, L.; SUNG, C. Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. **Metabolic Engineering**, v. 12, n.1, p. 1-7, 2010.

JIEFENG, L.; YIRAN, R.; SHANJING, Y. Repeated-batch cultivation of encapsulated *Monascus purpureus* by polyelectrolyte complex for natural pigment production. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, n. 18, p. 1013-1017, 2010.

JUNG, H.; KIM, C.; KIM, K.; SHIN, C. S. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51, p. 1302 – 1306, 2003.

JUNG, H.; KIM, C.; SHIN, C. S. Enhanced photostability of *Monascus* pigments derived with various amino acids via fermentation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 7108-7114, 2005.

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

KHAN, A.; BHIDE, A.; GADRE, R. Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 4911-4913, 2009.

KIM, C.; JUNG, H.; KIM, Y. O.; SHIN, C. S. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *monascus* pigments. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, p. 117–124, 2006.

KIM H. J.; KIM J. H.; JIN OH H.; SHIN C. S. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 649-655, 2002.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. **Energy Procedia**, v. 9, p. 274 – 282, 2011.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 1, 93-99, 2011.

KONO, I.; HIMENO, K. Antimicrobial activity of *Monascus pilosus* IFO 4520 against contaminants of Koji. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 8, p. 1494-1496, 1999.

KOSMIDER, A.; BIALAS, W.; KUBIAK, P.; DROZDZYNSKA, A.; CZACZYK, K. Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* sp. *shermanii*: Optimization of medium composition through statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 128–133, 2012.

KUO, C-F.; HOU, M-H.; WANG, T-S.; CHYAU, C-C.; CHEN, Y-T. Enhanced antioxidant activity of *Monascus pilosus* fermented products by addition of ginger to the medium. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, 915-922, 2009.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 929–934, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 7ª edição, 1984.

LAMBERT, M. e NEISH, A.C. Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. **Canadian Journal of Research**, v.28, n.3, p. 83-89, 1950.

LEE, B-K.; PARK, N-H.; PIAO, H. Y.; CHUNG, W-J. Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, n. 6, p. 341-346, 2001.

LEE, C-L.; WANG, J-J.; KUO, S-L.; PAN, T-M. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiinflammation agent-monascin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1254–1262, 2006.

LEE, K.; SINGH, P.; CHUNG, W-C.; ASH, J.; KIM, T. S.; HANG, L.; PARK, S. Light regulation of asexual development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 694–706, 2006.

LEE, Y.K.; CHEN, D.C.; CHAUVATCHARIN, S.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Production of monascus pigments by a solid-liquid state culture method. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 5, p. 516-518, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Nova York: Worth Publishers, 3ª Edição, 2000.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138 – 145, 2012.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, p. 1083–1095, 2010.

LIAN, X.; WANG, C.; GUO, K. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. **Dyes and Pigments**, v. 73, n.1, p. 121-125, 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 92-94, 2005.

LIN, Y-L.; WANG, T-H.; LEE, M-H.; SU, N-W. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 77, p. 965-973, 2008.

LINDEN, H. Circadian rhythms: A white-collar protein senses blue light. **Science**, v. 297, p. 777-778, 2002.

LIU, J.; REN, Y.; YAO, S. Repeated-batch cultivation of encapsulated *Monascus purpureus* by polyelectrolyte complex for natural pigment production. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 6, p. 1013-1017, 2010.

- LIU, Y.; KOH, C. M. J.; JI, L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3927–3933, 2011.
- LIU, X.; JENSEN, P. R.; WORKMAN, M. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 579–586, 2012.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation in batch process at controlled pH. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Technology Engineering**. v.1, n. 4, p.393-411, 1959.
- MA, F. e HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.
- MA, J.; LI, Y.; YE, Q.; LI, J.; HUA, Y.; JU, D.; ZHANG, D.; COOPER, R.; CHANG, M. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, n. 11, 5220-5225, 2000.
- MAMEDE FILHO, J. **Instalações elétricas industriais**. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A: Rio de Janeiro, 6ª edição, 2001.
- 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.
- MARTELLI, H.; SILVA, I. M.; SOUZA, N. O.; POMEROY, D. Glycerol as substrate for biomass and alpha-carotene production by *Rhodotorula lactosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 635-640, 1992.
- MARTINKOVA, L.; JUZLOVA, P.; VESELY, D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, 609-616, 1995.

MATURANA CORDOBA, A. Y. **Estudo da combustão direta da glicerina bruta e loira como alternativa de aproveitamento energético sustentável**. Tese (doutorado) em Engenharia Mecânica. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

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). Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MEINICKE, R. M.; VENDRUSCOLO, F.; MORITZ, D. E.; OLIVEIRA, D.; SCHMIDELL, W.; SAMOHYL, R. W.; NINOW, J. L. Potencial use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 238 - 242, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIYAKE, T.; MORI, A.; OKUNO, A. K. T.; USUI, Y.; SAMMOTO, F. S. H.; KARIYAMA, A. W. M. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 103–108, 2005.

MIYAKE, T.; NOZAKI, N.; SAMMOTO, H. Analysis of pigment compositions in various *Monascus* cultures. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 2, p. 194 – 197, 2008.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P.; **Microbial physiology**. Wiley-Liss: New York, 2002.

MORITZ, D. E. **Estudo da produção de pigmentos alimentares por *Monascus ruber* CCT3802 em cultivo submerso**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, vol. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

MUKHERJEE, G.; SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 188 – 192, 2011.

NITAYAVARDHANA, S. e KHANAL, S. K. Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. **Bioresource Technology**, n. 10, v.102, p. 5808 – 5814, 2011.

OROZCO, S. F. B.; KILIKIAN, B. V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT 3802. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 24, p. 263-268, 2008.

OROZCO, S. F. B.; PEREIRA D. G.; KILIKIAN B. V. Influência do pH na produção de pigmentos vermelhos e na micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em cultivo submerso. **SINAFERM - XIV** Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis - SC: Anais - artigo 133 CD-room. 2003.

OSRAM. Manual do curso Iluminação, Conceitos e Projetos.

Acessado em 22 de outubro de 2012 sob o endereço:

http://www.osram.com.br/osram_br/Ferramentas_%26_Catlogos/_pdf/Arquivos/Iluminacao_Geral/Manual_do_Curso_Iluminacao%2c_Conceitos_e_Projetos/AF_apostila_conceitos_e_projetos_SITE.pdf.

PADULA, A. D.; SANTOS, M. S.; FERREIRA, L.; BORENSTEIN, D. The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects. **Energy Policy**, v. 44, p. 395–405, 2012.

PAPANIKOLAOU, S. e AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 5, p. 542-547, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 60 -71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potencial producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n.4, p. 737-744, 2002.

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.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel**: Uma aventura tecnológica num país engraçado. 2003. Disponível em: <[http:// www.tecbio.com.br](http://www.tecbio.com.br)>.

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**, v. 30, n.4, p. 333-341, 1995.

PATTANAGUL, P.; PINTHONG, R.; PHIANMONGKHOL, A.; THARATHA, S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 20-23, 2008.

PEREIRA, D.G.; KILIKIAN, B.V. Effect of yeast extract on growth kinetics of *Monascus purpureus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 92, p. 311-316, 2001.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Biodiesel: An Overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

PISAREVA, E. e KUJUMDZIEVA, A. Taxonomic investigation and growth characteristics of citrinin free *Monascus pilosus* C₁ strain. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 20, n. 1, 2006.

PITT J. I. e HOCKING A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Chapman & Hall, 1999.

PORTE, A. F.; SCHNEIDER, R. C. S.; KAERCHER, J. A.; KLAMT, R. A.; SCHMATZ, W. L.; SILVA, W. L. T. S.; SEVERO FILHO, W. A. Sunflower biodiesel production and application in family farms in Brazil. **Fuel**, v. 89, p. 3718–3724, 2010.

PURSCHWITZ, J.; MÜLLER, S.; KASTNER, C.; SCHÖSER, M.; HAAS, H.; ESPESO, E. A.; ATOUI, A.; CALVO, A. M.; FISCHER, R. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. **Current Biology**, v. 18, p. 255–259, 2008.

RAMIREZ, D. A.; MUNOZ, S. V.; ATEHORTUA, L.; MICHEL JR, F. C.; Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9213–9220, 2010.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 37, 2007.

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGUE, T. T.; BOURTOMM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210–218, 2011.

SALEH, J.; TREMBLAY, A. Y.; DUBÉ, M. A. Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. **Fuel**, v. 89, p. 2260–2266, 2010.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, 6473 – 6490, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociência industrial**. Volume 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. 1ª Ed, 2001.

SCHMIDT-HEYDT, M.; RÜFER, C.; RAUPP, F.; BRUCHMANN, A.; PERRONE, G.; GEISEN, R. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 229–237, 2011.

SILVA, G. P.; MACK, CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.

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

SINGH, P. K. e PHADWAL, K. Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. **Bioresource Tecnology**, v. 90, p. 55-58, 2003.

SINGHABHANDHU, A. e TEZUKA, T. A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock. **Energy**, v. 35, p. 2493 -2504, 2010.

SUH, J-H. E SHIN, C. S. Analysis of the morphologics changes of *Monascus* sp. J101 cells cocultured with *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 193, p. 143-147, 2000.

SUN, L-H.; SONG, Z-H.; SUN, Y-Q.; XIU, Z-L. Dynamic behavior of glycerol–glucose co-fermentation for 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 under micro-aerobic conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1401–1407, 2010.

TANG, S.; BOEHME, L.; LAM, H.; ZHANG, Z. *Pichia pastoris* fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 157–162, 2009.

TAO, J.; WANG, X.; SHEN, Y.; WEI, D. Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 969-972, 2005.

- TENG, S-S. e FELDHEIM, W. Anka and Anka pigment production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 26, p. 280-282, 2001.
- THOMPSON, J. e HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006.
- TIPLER, P. A. **Física para cientistas e engenheiros - Volume 2**. LTC –livros técnicos e científicos: Rio de Janeiro, 4ª Edição edição, 2000.
- TSENG, Y.Y.; CHEN, M.T.; LIN, C.F. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, 31–37, 2000.
- VELMURUGAN, P.; LEE, Y. H.; VENIL, C. K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J-C.; OH, B-T., Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n. 109, p. 346 – 350, 2010.
- VENDRUSCOLO, F. **Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* CCT 3802**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- VENDRUSCOLO, F.; PITOL, L. O.; CARCIOFI, B. A. M.; MORITZ, D. E.; LAURINDO, J. B.; SCHMIDELL, W.; NINOW, J. L. Construction and application a vane system in a rotational rheometer for determination of the rheological properties of *Monascus ruber* CCT 3802. **Journal of Biorheology**, v. 24, p. 29-35, 2010.
- YANG, J-H.; TSENG, Y-H.; LEE, Y-L.; MAU, J-L. Antioxidant properties of methanolic extracts from monascal rice. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 740-747, 2006.
- YAZDANI, S. S. e GONZALEZ, K. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for de biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213-219, 2007.

YEN, H-W.; YANG, Y-C; YU, Y-H. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 453-456, 2012.

YONGSMITH, B.; TABLOKA, W.; YONGMANITCHAI, W.; BAVAVODA, R. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 85-90, 1993.

YOSHIZAKI, Y.; SUSUKI, T.; TAKAMINE, K.; TAMAKI, H.; ITO, K.; SAMESHIMA, Y. Characterization of glucoamylase and α -amilase from *Monascus anka*: Enhanced production of α -amilase in red koji. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 670-674, 2010.

WANG, S.; YEN, Y.; TSAIO, W.; CHANG, W.; WANG, C. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 31, p. 337-344, 2002.

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201-223, 2001.

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

WONG, H. C. e KOEHLER, P. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 589-592, 1981.

XU, W. Study on the liquid fermentation to produce *Monascus* pigment with corn starch and antibacteria. **Advanced Material Research**, n. 1336, p. 183-185, 2011.

ZENEON, O. e PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde/ANVISA: São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

ZHENG, W.; ZHANG, M.; ZHAO, Y.; MIAO, K.; JIANG, H. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. **Bioresource Technology**, v.100, p. 4481–4487, 2009.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

MEINICKE, Rose Marie; VENDRUSCOLO, Francielo; MORITZ, Denise Esteves; OLIVEIRA, Débora de, SCHMIDELL, Willibaldo; SAMOHYL, Robert Wayne; NINOW, Jorge Luiz. Potencial use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 238 - 242, 2012.

BÜHLER, Rose Marie Meinicke; DUTRA, Anderson Cesar; VENDRUSCOLO, Francielo; MORITZ, Denise Esteves; NINOW, Jorge Luiz. Monascus pigment production in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 9 - 13, 2013.

Artigo completo a ser submetido:

BÜHLER, Rose Marie Meinicke; MÜLLER, Bruna Luise; MORITZ, Denise Esteves; NINOW, Jorge Luiz. Effect of light on growth and pigment production of *Monascus ruber* in submerged fermentation.

Trabalhos publicados em anais de eventos:

MEINICKE, Rose Marie; MORITZ, Denise Esteves; NINOW, Jorge Luiz. Pigmento Natural Monascus: uma alternativa aos pigmentos sintéticos. In: **III Simpósio de Segurança Alimentar**, Florianópolis, 2010.

MEINICKE, Rose Marie, MÜLLER, Bruna Luise, MORITZ, Denise Esteves, NINOW, Jorge Luiz. Evaluation of the production of Monascus pigments using biodiesel co-products as substrates. In: **IV Congresso Internacional de Bioprocessos na Indústria de Alimentos**, Curitiba, 2010.

MEINICKE, Rose Marie, MÜLLER, Bruna Luise, MORITZ, Denise Esteves, NINOW, Jorge Luiz. Influence of nitrogen source on the production of red pigments by *Monascus ruber* using glycerine as substrate. In: **V Simpósio em Microbiologia Aplicada**, Rio Claro/SP, 2011.

MEINICKE, Rose Marie, MÜLLER, Bruna Luise, MORITZ, Denise Esteves; NINOW, Jorge Luiz. Parâmetros cinéticos da produção de pigmentos *Monascus* utilizando co-produtos do biodiesel. In: **VII Simpósio de Alimentos para a Região Sul**, Passo Fundo, 2011.

MEINICKE, Rose Marie; DUTRA, Anderson Cesar; MORITZ, Denise Esteves; NINOW, Jorge Luiz. Produção de pigmentos *Monascus* em biorreator utilizando glicerina e glicose como substratos. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas/SP, 2012.

MEINICKE, Rose Marie; DUTRA, Anderson Cesar; MORITZ, Denise Esteves; NINOW, Jorge Luiz. Influence of light intensity and wavelenght on growth and morfology of *Monascus ruber* CCT 3802. In: **16 th World Congress of Food Science and Technology**, Foz do Iguaçu/PR, 2012.

BÜHLER, Rose Marie Meinicke; DUTRA, Anderson Cesar; MORITZ, Denise Esteves; NINOW, Jorge Luiz. Avaliação da produção de amilase, lípase e pigmentos por *Monascus ruber* utilizando glicerina como substrato. In: **X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Blumenau/SC, 2012.

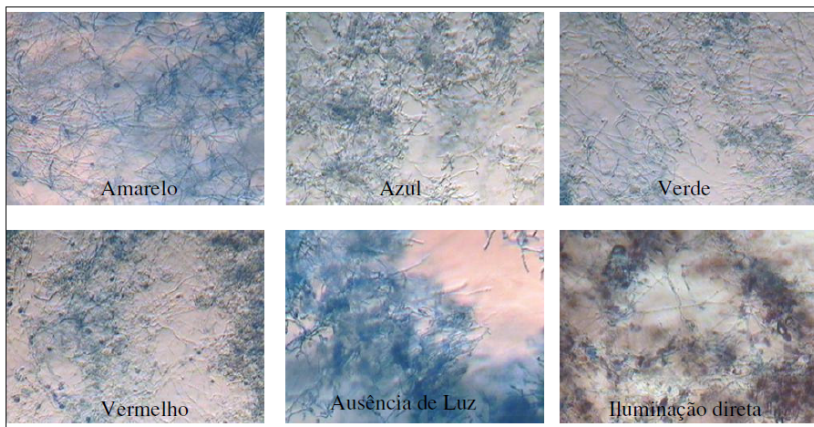
APÊNDICE A – Imagens das colônias de *Monascus ruber*

FIGURA 1A – Aumento de 100 X das colônias de *Monascus ruber* em placas cobertas com filme colorido e expostas à fonte de iluminação (lâmpada de 15 W).

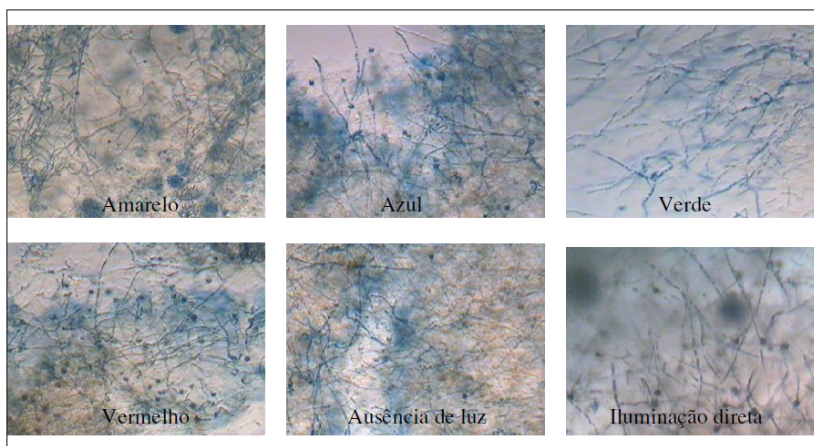


FIGURA 2A – Aumento de 100 X das colônias de *Monascus ruber* em placas cobertas com filme colorido e expostas à fonte de iluminação (lâmpada de 25 W).

APÊNDICE B – Resultado Teste de Tukey

TESTE DE TUKEY					
DADOS DO PROCESSO					
Tabela da Anova					
	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fator	5	1,18482624	0,236965248	27,04032201	0,000479642
Resíduos	6	0,05258042	0,008763403		
Níveis	Centro	Limite.Inferior	Limite.Superior	P-valor	
Azul-Amarelo	0,3216	-0,050965597	0,694165597	0,090165688	
Direta-Amarelo	-0,3624	-0,734965597	0,010165597	0,056123207	
Preto-Amarelo	0,5496	0,177034403	0,922165597	0,00815728	
Verde-Amarelo	0,4008	0,028234403	0,773365597	0,036500435	
Vermelho-Amarelo	0,4512	0,078634403	0,823765597	0,021317121	
Direta-Azul	-0,684	-1,056565597	-0,311434403	0,002609688	
Preto-Azul	0,228	-0,144565597	0,600565597	0,274816265	
Verde-Azul	0,0792	-0,293365597	0,451765597	0,947002509	
Vermelho-Azul	0,1296	-0,242965597	0,502165597	0,735878738	
Preto-Direta	0,912	0,539434403	1,284565597	0,000536562	
Verde-Direta	0,7632	0,390634403	1,135765597	0,001441905	
Vermelho-Direta	0,8136	0,441034403	1,186165597	0,001014212	
Verde-Preto	-0,1488	-0,521365597	0,223765597	0,63139464	
Vermelho-Preto	-0,0984	-0,470965597	0,274165597	0,884283915	
Vermelho-Verde	0,0504	-0,322165597	0,422965597	0,991977243	

FIGURA 1B – Resultado para análise de variância e Teste de *Tukey* para os resultados da velocidade de crescimento radial em placas cobertas com filme colorido.

APÊNDICE C – Cálculo do $\mu_{\text{máx}}$

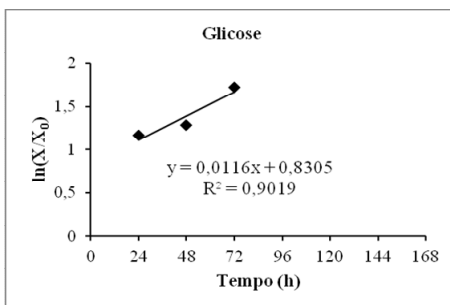


FIGURA 1C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicose como substrato em frascos de *Erlenmeyer*.

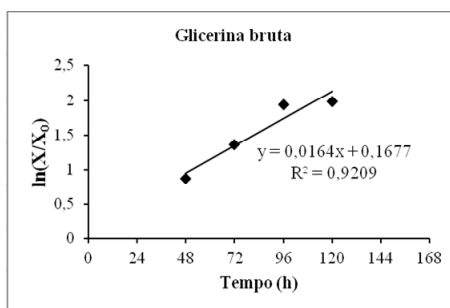


FIGURA 2C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frascos de *Erlenmeyer*.

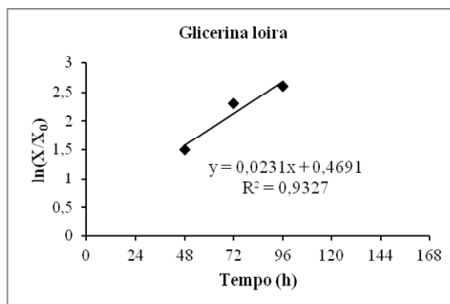


FIGURA 3C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina loira como substrato em frascos de *Erlenmeyer*.

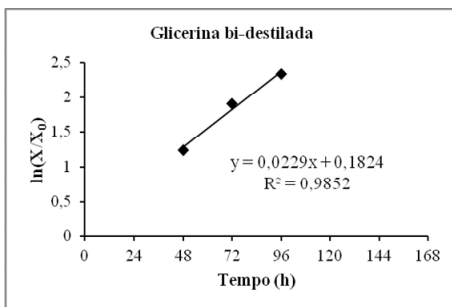


FIGURA 4C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bi-destilada como substrato em frascos de *Erlenmeyer*.

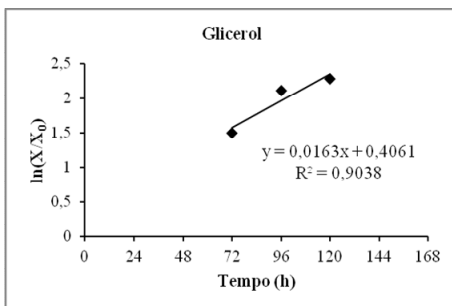


FIGURA 5C – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerol como substrato em frascos de *Erlenmeyer*.

APÊNDICE D – Cálculo do $\mu_{\text{máx}}$

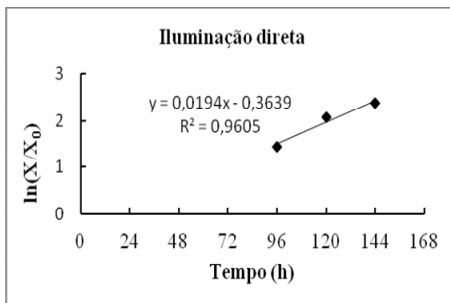


FIGURA 1D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de *Erlenmeyer* submetido à fonte de iluminação contínua (sem filme).

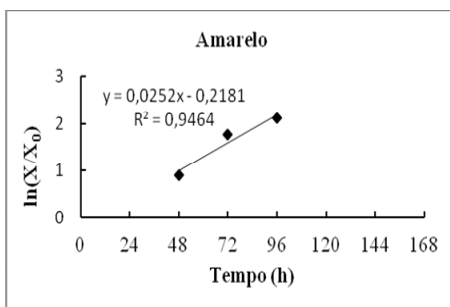


FIGURA 2D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de *Erlenmeyer* submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme amarelo.

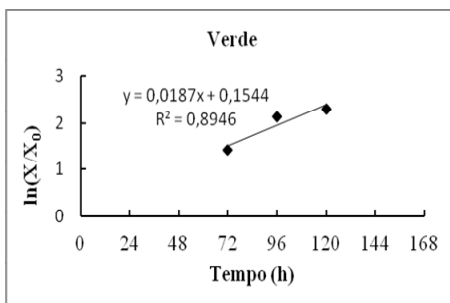


FIGURA 3D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de *Erlenmeyer* submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme verde.

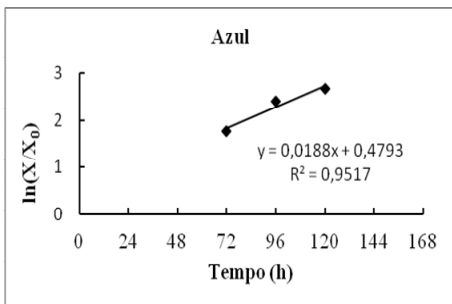


FIGURA 4D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de *Erlenmeyer* submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme azul.

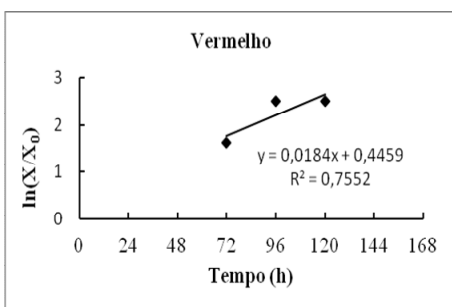


FIGURA 5D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de *Erlenmeyer* submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme vermelho.

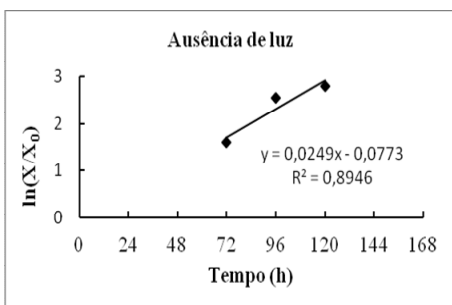


FIGURA 6D – Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial em cultivo realizado com 20 g/L de glicerina bruta como substrato em frasco de *Erlenmeyer* submetido à fonte de iluminação contínua e coberto com filme preto.

APÊNDICE E – Cálculo dos parâmetros cinéticos

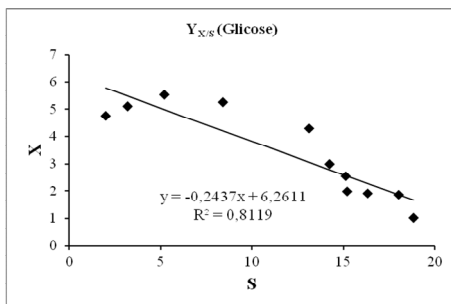


FIGURA 1E – Fator de conversão de substrato em biomassa para o cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicose como substrato.

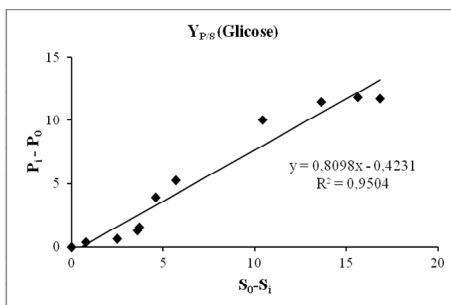


FIGURA 2E – Fator de conversão de substrato em pigmento vermelho para o cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicose como substrato.

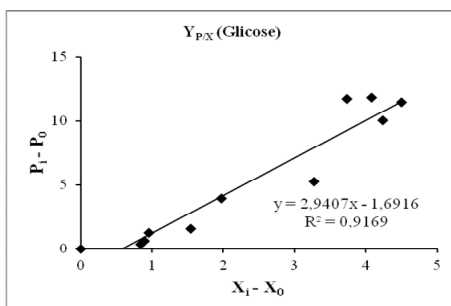


FIGURA 3E – Fator de conversão de biomassa em pigmento vermelho para o cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicose como substrato.

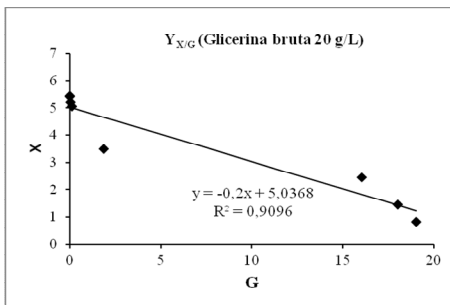


FIGURA 4E – Fator de conversão de substrato em biomassa para o cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta como substrato.

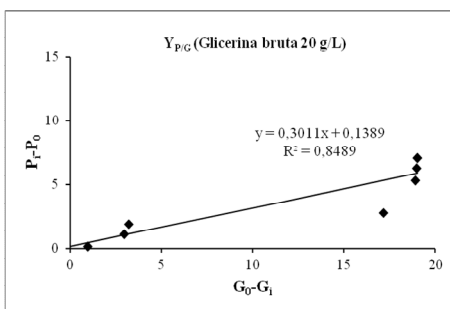


FIGURA 5E – Fator de conversão de substrato em pigmento vermelho para o cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta como substrato.

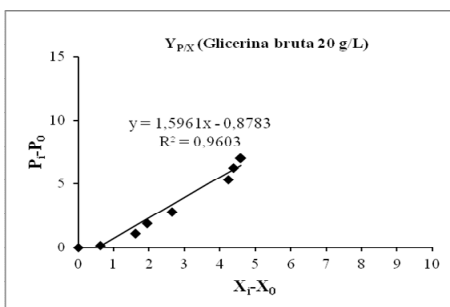


FIGURA 6E – Fator de conversão de biomassa em pigmento vermelho para o cultivo de *Monascus ruber* em biorreator utilizando 20 g/L de glicerina bruta como substrato.