

Bagaço de malte como substrato para produção de biopigmentos produzidos por *Monascus ruber* CCT 3802

Camila Fernanda Dias de Oliveira¹, Francielo Vendruscolo², Jaqueline Pires Vital da Costa¹, Welker Denner Bernardes de Araújo¹

¹Universidade Federal de Goiás-UFG, Campus Samambaia, Goiás, Brasil. E-mail: camilaferdias@gmail.com, francielo@hotmail.com, jvital.engenharia@gmail.com, araujowelker@gmail.com

Recebido: 15/04/2016; Aceito: 07/06/2016.

RESUMO

O presente estudo busca, evidenciar o reaproveitamento do resíduo agroindustrial de bagaço de malte, na fabricação de pigmentos naturais produzidos por *Monascus*, determinando a velocidade de crescimento radial pelo fungo filamentosos *Monascus ruber* CCT 3802, em cultivo sólido sob diferentes concentrações de bagaço de malte. A determinação da velocidade de crescimento radial foi realizada em meio ágar dextrose batata (PDA) sob diferentes concentrações de substrato bagaço de malte (5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), além da placa padrão contendo apenas PDA. A maior velocidade de crescimento radial do *Monascus ruber* foi obtida da placa contendo 40 g L⁻¹ de bagaço de malte 0,1383 mm h⁻¹, o que corresponde a um crescimento de 3,32 mm dia⁻¹, ou seja, um aumento de 55% quando comparado com meio PDA, mostrando que quanto maior a concentração de bagaço de malte, maior a velocidade de crescimento radial, consequentemente maior a produção de pigmentos. O bagaço de malte apresentou influência direta nos resultados da velocidade de crescimento radial do micro-organismo *Monascus ruber*. Portanto, pode-se utilizar o resíduo bagaço de malte como substrato em cultivo sólido para a obtenção dos pigmentos de *Monascus ruber*.

Palavras-chave: Resíduo, crescimento radial, cultivo sólido.

Malt bagasse as substrate for the production of biopigments produced in *Monascus ruber* CCT 3802

ABSTRACT

This study evaluated the reuse of malt-bagasse agroindustry residues, in making natural pigments produced by *Monascus*, determining the radial growth rate by filamentous fungus *Monascus ruber* CCT 3802, solid cultivation under different malt residue concentrations. The determination of the radial growth rate was performed in potato-dextrose-agar (PDA) under different malt bagasse substrate concentrations (5, 10, 20 and 40 g L⁻¹), beyond the standard plate containing just PDA. The greater radial growth rate of *Monascus ruber* was obtained plate containing 40 g L⁻¹ of malt-bagasse residues 0.1383 mm h⁻¹, which corresponds to an increase of 3.32 mm d⁻¹, an increase of 55% compared with PDA medium, showing that the higher the concentration of malt-bagasse residue, the greater the radial growth rate, consequently greater production of pigments. The malt-bagasse residues showed a direct influence on the results of the radial growth rate of the microorganism *Monascus ruber*. Therefore, one can use malt-bagasse residue as substrate in solid cultivation to obtain pigments of *Monascus ruber*.

Key words: Residue, radial growth, solid cultivation.

1. Introdução

A cor é um dos primeiros atributos sensoriais utilizados para escolha e aquisição de um alimento. Embora subjetiva é fundamental pois, influencia na sensação de outras características como o aroma, o sabor e a textura. Portanto, a manutenção da cor natural do alimento constitui em um fator fundamental para o marketing, em face da primeira avaliação do consumidor frente a este novo produto, em consequência, a utilização de pigmentos naturais estão ganhando popularidade como uma alternativa (WIBOWO et al., 2015; KONGRUANG, 2011).

Pigmentos naturais são provenientes de fontes como as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos, bactérias, leveduras e algas). Têm ganhado cada vez mais atenção, devido a possibilidade de produção e a avaliação da tecnologia de cultivo para otimizar um maior rendimento. No entanto, pigmentos provenientes de plantas possuem desvantagens tais como: instabilidade contra a luz, calor ou pH, baixa solubilidade em água e são frequentemente insuficientes para suprir as necessidades industriais ao longo do ano, por motivos de sazonalidade. Assim faz-se necessário o uso da produção biotecnológica por exemplo, a qual possibilita a obtenção dos biopigmentos naturais em grande escala (BOO et al., 2012; KUMAR et al., 2015).

Embora sejam muitas vezes associados a doenças de fato, muitos micro-organismos são responsáveis por patologias que afetam animais e seres humanos, eles também são muito importantes para a elaboração de novos produtos empregando processos fermentativos, como os pigmentos alimentares. Dentre os micro-organismos produtores de pigmentos destaca-se o *Monascus*, que é um fungo cuja fermentação origina pigmento amarelo, laranja e vermelho (MAPARI et al., 2005).

A utilização deste fungo é muito difundida no Japão, China, Indonésia, Taiwan, Índia e Coréia. Estes pigmentos são utilizados nestes países na coloração de arroz, peixes, vinhos, bebidas, até usos medicinais e ainda, uma promissora utilização na coloração de produtos cárneos em substituição aos sais de nitrito que conferem coloração vermelha e, ao mesmo tempo, a produção de nitrosaminas, compostos que possuem efeitos cancerígenos (HAJJAJ et al., 2012).

A produção de pigmentos por espécies de *Monascus*, geralmente é realizada pelo processo de fermentação em estado sólido. Fungos filamentosos possuem capacidades extremas de adaptação. Colonizam substratos sólidos com facilidade pela penetração das hifas no suporte sólido, crescem em baixo conteúdo de umidade, além da obtenção de produtos concentrados (PANDEY et al., 2001). Porém, o cultivo sólido é muito afetado pelas composições dos meios, fontes de nitrogênio, concentração de oxigênio e o valor inicial do pH no

sistema. Portanto, a escolha de uma boa fonte de substrato é importante no sucesso do crescimento dos micro-organismos. O substrato ideal é aquele que supre todos os nutrientes necessários aos fungos para sua função ótima (XU et al., 2006).

A utilização de resíduos agroindustriais da indústria de alimentos pode ser a grande oportunidade para que os custos de tais pigmentos sejam diminuídos. O bagaço de malte por sua vez, é quantitativamente o principal subproduto do processo cervejeiro, sendo gerado de 14-20 kg a cada 100 litros de cerveja produzida, será reaproveitado neste presente estudo. Além disso, sob o ponto de vista ambiental, o bagaço de malte constitui-se um problema, pois apresenta elevados teores de carboidratos, proteínas, gorduras e fibras, que lhe conferem uma demanda química de oxigênio cerca de cem vezes maior que a do esgoto doméstico (CORDEIRO et al., 2012).

Deste modo, o presente estudo busca, evidenciar o reaproveitamento deste resíduo agroindustrial na fabricação de pigmentos naturais produzidos por *Monascus*, determinando a velocidade de crescimento radial pelo fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo sólido sob diferentes concentrações de bagaço de malte.

2. Material e Métodos

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802, obtido da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), mantido em ágar dextrose batata (PDA) (39 g L⁻¹) a 4 °C.

A manutenção do isolado foi realizada em tubos de ensaio contendo PDA inclinado, esterilizados a 121 °C durante 15 minutos. Após o resfriamento os fungos foram inoculados conforme a metodologia de Hajjaj et al. (2012), em que a alçada do fungo foi transferida para os tubos e incubados por 7 dias a 30 °C. Este material foi utilizado para inocular as placas de petri.

A determinação da velocidade de crescimento radial foi realizada em meio PDA sob diferentes concentrações de substrato bagaço de malte (5, 10, 20 e 40 g L⁻¹), além da placa padrão contendo apenas PDA, de acordo com a metodologia proposta por Vendruscolo et al. (2010). Ou seja, no arranjo de uma suspensão de esporos, três alçadas do micro-organismo cultivados em tubos de ensaio com meio inclinado, foram transferidos para o cultivo em tubos de *Duran* contendo 1 mL de ágar bacteriológico 0,2% (p/v) previamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

O PDA e as concentrações de bagaço de malte foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos, posteriormente vertido em placas de Petri de 100 mm. Depois de solidificados, com auxílio de ponteira estéril de

micropipeta com diâmetro de 1,4 mm, os meios de cultivo foram inoculados através da imersão da ponteira na suspensão de esporos e posteriormente toque no centro de cada placa em ambiente asséptico (bancadas desinfetadas com álcool etílico 70% v/v e incidência ultravioleta por 30 minutos no gabinete de segurança).

Após inoculação, foram traçadas três raias no fundo de cada placa, passando pelo ponto de inoculação. Posteriormente, foram incubadas em estufa a 30 °C. A cada 24 horas, foram medidos os diâmetros das colônias do *Monascus ruber* CCT 3802. Cada experimento foi composto por 5 repetições acompanhado por um controle sem o substrato.

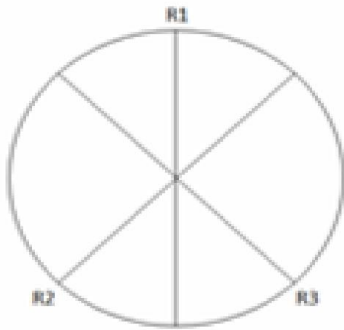


Figura 1. Representação dos raios desenhados no fundo das placas de Petri.

A velocidade de crescimento radial nos meios utilizados foi determinada pela declividade da reta obtida pela regressão linear, conforme a Equação 1.

$$r(t) = a + V_{CR} \cdot t \quad [1]$$

em que, $r(t)$ é o raio da colônia (mm); a é a constante da regressão linear; V_{CR} é a velocidade de crescimento radial ($\text{mm} \cdot \text{h}^{-1}$); t é o tempo de cultivo (h).

Para as diferentes velocidades de crescimento obtidas e para os diferentes meios analisados, foram comparadas as declividades das retas em gráficos, utilizando-se o software *Microsoft Excel® 2010*. Para verificar se há diferença significativa entre as velocidades obtidas das curvas de regressão, foi utilizado o teste-t pelo software *STATISTICA 7.1*.

3. Resultados e Discussão

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 micro-organismos e meios de cultura e a avaliação do efeito do substrato nos fatores de crescimento.

A Figura 2 apresenta as curvas das colônias do *Monascus ruber* CCT 3802 em PDA sob diferentes concentrações de Bagaço de Malte, durante 216 horas de

cultivo, onde o crescimento observado se aproximou da linearidade nos diferentes meios.

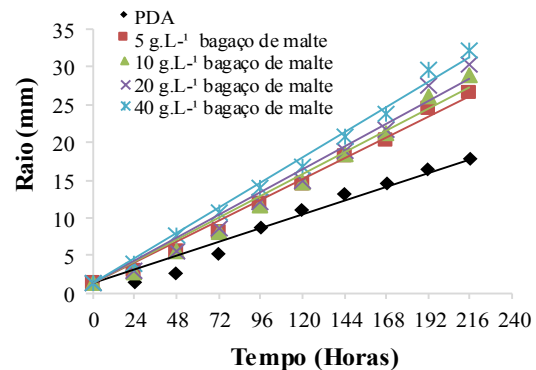


Figura 2. Curva de crescimento radial de *Monascus ruber* em placas contendo diferentes concentrações de bagaço de malte.

A velocidade de crescimento radial foi determinada através da Equação 1, onde o coeficiente angular da equação da reta representa a velocidade. A equação do raio em função do tempo foi encontrada através da regressão linear dos resultados obtidos na Tabela 1.

Aplicou-se também a análise estatística para comparação das declividades das retas, e as velocidades obtidas foi aplicada a análise de variância (ANOVA). O valor de F calculado foi de 4686,93, valor esse superior ao valor de F tabelado ($F_{4,2} = 81,01$), podendo-se afirmar, portanto, que houve diferença significativa entre as curvas obtidas, ao nível de significância de ($p \leq 0,05$). De tal modo, para identificar o quanto as amostras diferenciam-se significativamente, aplicou-se o teste de Tukey ao nível de confiança de 95%, como mostra na Tabela 1.

Foi possível verificar que houve crescimento nas placas com meio teste contendo bagaço de malte e também nas placas contendo meio padrão PDA. No entanto observa-se que houve diferenças estatísticas para todas as concentrações de bagaço de malte aplicada, quando comparadas com o meio PDA. Já para as concentrações de 5, 10 e 20 g L^{-1} de bagaço de malte não diferiram entre si ao nível de ($p \leq 0,05$) de significância. Logo, para a concentração de 40 de bagaço de malte mostrou-se diferente estatisticamente apenas da concentração 5 g L^{-1} e do meio padrão PDA ao nível de ($p \leq 0,05$) de significância.

A maior velocidade de crescimento radial do *M. ruber* foi obtida da placa contendo 40 g L^{-1} de bagaço de malte 0,1383 mm h^{-1} , o que corresponde ao crescimento de 3,32 mm dia^{-1} , ou seja, um aumento de 55% quando comparado com meio PDA, mostrando que quanto maior a concentração de bagaço de malte, maior a velocidade de crescimento radial, consequentemente maior a produção de pigmentos. Nas placas contendo 5, 10 e 20 g L^{-1} , a velocidade de crescimento radial variou de 0,1141 a 0,1253 mm h^{-1} , ou seja, 2,73 a 3,0 mm dia^{-1} .

Tabela 1. Equação de regressão linear, coeficiente de regressão (R²) e velocidade de crescimento radial (V_{CR}) para o fungo *Monascus ruber* em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de bagaço de malte.

Concentrações de Bagaço de malte (meio de cultivo) (g.L ⁻¹)	Equação de regressão	R ²	V _{CR} (mm h ⁻¹)	V _{CR} (mm dia ⁻¹)
PDA	r(t) = 0,076t + 1,4	0,9787	0,076±0,0027 ^a	1,82
5,0	r(t) = 0,1141t + 1,4	0,9888	0,1141±0,0044 ^b	2,73
10	r(t) = 0,1202t + 1,4	0,9796	0,1202±0,0226 ^{bc}	2,88
20	r(t) = 0,1253t + 1,4	0,9817	0,1253±0,0025 ^{bc}	3,00
40	r(t) = 0,1383t + 1,4	0,9862	0,1383±0,0310 ^c	3,32

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não difere estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a nível de (p ≤ 0,05) de significância.

Já para as placas com meio PDA, foram observadas crescimento em torno de 0,076 mm h⁻¹, que corresponde a 1,82 mm dia⁻¹. Porém Carvalho et al. (2005) determinaram a velocidade média de crescimento radial de quatro linhagens de *Monascus purpureus* em meio PDA a 30°C. Para estas linhagens encontraram velocidades entre 2,3 e 3,1 mm dia⁻¹, velocidades maiores do que as encontradas para o *Monascus ruber* neste trabalho.

4. Conclusões

O bagaço de malte apresentou influência direta no crescimento radial do micro-organismo *Monascus ruber*. Maiores velocidades de crescimento radial foram obtidas quando o *Monascus ruber* foi cultivado em meio contendo 40 g.L⁻¹. Portanto pode-se utilizar o resíduo bagaço de malte como substrato em meio sólido para a obtenção dos pigmentos de *Monascus ruber*.

Referências Bibliográficas

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**. Gwangju-City, South Korea, v. 40, p. 129-135, 2012.

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**. Curitiba-PR, Brazil, v. 48, n.6, p. 885-894, 2005.

CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, A. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Mossoró-RN, Brasil, v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.

HAJJAJ, H.; FRANÇOIS, J. M.; GOMA, G. BLANC, P. J. Effect of Amino Acids on Red Pigments and Citrinin Production in *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**. Morocco, v. 77, n. 3, p. 156-159, 2012.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Bangkok, v. 2, n. 12, p. 93-99, 2011.

KUMAR, A.; VISHWAKARMA, H. S.; SINGH, J.; DWVEDI, S.; KUMAR, M. Microbial pigments: production and their applications in various industries. **International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**. Kanpur, India, v. 5, n. 1, p. 203-212, 2015.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, 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**. Denmark, v. 16, p. 231-238, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech, 2001. 221p.

VENDRUSCOLO, F.; PITOL, L. O.; CARCIOFI, B. A.; MORITZ, D. E.; LAURINDO, J. B.; SCHMIDELL, W.; NINOW, J. L.; BARBI, I. Construction and application a vane system in a rotational rheometer for determination of the rheological properties of *Monascus ruber* CCT 3802. **Journal of Biomolecular**. Florianópolis-SC, v. 24, n. 24, p. 29-35, 2010.

WIBOWO, S.; VERVOORT, L.; TOMIC, J.; SANTIAGO, J. S.; LEMMENS, L.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. **Food Chemistry**. Kasteelpark Arenberg, Belgium, v. 33, n. 1, p. 330-340, 2015.

XU, B. J.; JIA, X. Q.; GU, L. J.; SUNG, C. K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**. Yusung-Gu, South Korea, v. 17, n. 4, p. 271-285, 2006.