



# Bioconversão do bagaço de Maçã

Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado

A população mundial está em torno de 6 bilhões, sendo que, no Brasil, já somos mais de 157 milhões de habitantes. Esse aumento populacional traz como consequência imediata e inevitável um aumento proporcional na necessidade de alimentos.

Os recursos naturais para manter esta população são limitados e somente um aproveitamento racional e eficiente poderá fazê-los produzir alimentos em quantidade e qualidade satisfatória para atender às crescentes necessidades do homem.

Por outro lado, a população humana produz milhões de toneladas de resíduos agro-industriais anualmente e, na maioria das vezes, esses rejeitos são eliminados no meio ambiente, provocando como consequência um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza. Embora esse tipo de poluente seja biodegradável, é necessário um tempo mínimo para ser mineralizado e, em virtude da intensa atividade humana na Terra, observa-se a cada dia um aumento na dificuldade de reciclagem natural desses nutrientes.

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agro-industriais. Só no Estado de Santa Catarina, o maior produtor de maçã do país, com mais de 1 milhão de toneladas anuais (Fischer, 1999), 25% do total da maçã utilizada pelas indústrias de suco, polpa e aromas constituem-se de bagaço.

O bagaço produzido geralmente é utilizado como ração animal ou é simplesmente dispensado no solo. En-



**Figura 1:** Prensagem das maçãs com conseqüente produção do bagaço (Fischer Sucos IND e COM. LTDA)

tretanto, seu valor nutritivo é limitado devido ao baixo teor protéico (Zheng e Shetty, 1998).

A maioria dos subprodutos vegetais, rejeitos das indústrias de alimentos, são pobres em nutrientes como proteínas e vitaminas e muitas vezes ricos em fibras não digeríveis. Uma alternativa para aumentar o valor agregado desses resíduos seria a sua bioconversão utilizando microrganismos, principalmente fungos. Muitos trabalhos têm sido propostos nesta área ultimamente (Jalc et al. 1996; Gao et al. 1997; Adamovic et al. 1998; Nigam, 1998; Zheng e Shetty, 1998; Roberto et al. 1999; Scerra et al. 1999; entre outros).

As bactérias, Fungos e algas, produzidas em grandes quantidades, podem ser utilizadas para alimentação animal, inclusive para o homem (Durán, 1989). Esses organismos são fontes atrativas de alimento, porque podem ser cultivados em despejos ou subprodutos industriais, com produção de grande quantidade de células

**Silas Granato Villas Bôas**

Biólogo, Mestrando em Biotecnologia,  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia  
CCB - UFSC - CEP: 88040-900  
Florianópolis - SC  
sgvb@hotmail.com

**Elisa Esposito**

Doutora em Engenharia Química pela UNICAMP  
Professora Visitante do Departamento de  
Microbiologia e  
Parasitologia CCB - UFSC - CEP: 88040 - 900  
Florianópolis - SC  
elisa@ccb.ufsc.br

ricas em proteínas, denominadas SCP (do inglês: *single cell protein*).

A produção de SCP é empregada em processos tecnologicamente intensivos que permitem alta produção volumétrica de proteínas. A produção desse tipo de proteínas é independente de efeitos climáticos e alterações ambientais. Entretanto, tais processos requerem investimentos substanciais de capital e devem ser operados com a máxima eficiência (Durán, 1989). A fonte de carbono representa de 40 a 59 % do custo da produção de SCP. Por esta razão, tem sido de grande interesse o uso de fontes alternativas de carbono que estejam mais disponíveis e mais viáveis economicamente.

Os produtos enriquecidos com este tipo de proteína podem ser usados como suplemento protéico na alimentação humana, ou como ingredientes alimentícios que funcionam como aromatizantes, dispersantes e até mesmo como ração animal. Os microrganismos crescem muito rapidamente e são produzidos em grande quantidade. Um boi de 450 kg ganha cerca de 0,45 kg de proteína por dia; em contraste, 450 kg de leveduras produziram diversas toneladas de proteínas em apenas um dia! O conteúdo de proteína das células microbianas é muito alto e essas proteínas, na maioria das vezes, contêm todos os aminoácidos essenciais (Pelczar et al. 1996). Outra grande vantagem deste tipo de processo é que muitos microrganismos, particularmente as leveduras, produzem alto conteúdo de vitaminas.

O bagaço de maçã processado pelas indústrias de suco, polpa e aromas pode ser empregado como fonte de carboidratos para o crescimento de fungos. Este resíduo apresenta grande quantidade de fibras que são formadas por polímeros de elevada massa molar, como o amido, hemicelulose, celulose, pectina e lignina. É um substrato rico em açúcares simples como glicose, frutose e sacarose, além de outros mono e dissacarídeos. Todavia o teor de proteínas, como já mencio-

nado, vitaminas e sais minerais são muito baixos. Com o cultivo de fungos adequados, este resíduo pode aumentar seu valor nutricional, pois será acrescido de proteínas microbianas, sais como fosfato, potássio e cálcio, além de vitaminas do complexo B, importantes fatores de crescimento para animais (Bononi e Trufen, 1986; Bhalla e Joshi, 1994; Rahmat et al. 1995; Joshi et al. 1998; Zheng e Shetty, 1998).

### Metodologia

Para se converter biologicamente o bagaço de maçã, utilizamos dois fungos em tratamento seqüencial. Primeiramente realizou-se uma fermentação em estado líquido utilizando a levedura *Candida utilis*. Esta levedura tem sido muito empregada na bioconversão de detritos agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho (Tentratian e Fields, 1990), palha de arroz (Araújo et al. 1985), cascas

de, teor protéico, teor vitamínico e disponibilização de sais minerais.

A cepa de *Candida utilis* (CCT3469) empregada nesse trabalho é proveniente da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Toselo", sediada em Campinas (SP) e o bagaço de maçã foi cedido pela "Fisher Sucos Indústria e Comércio LTDA", sediada em Fraiburgo (SC).

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo da levedura cultivada em meio YM (*Yeast Mali*), e foram empregados 10 % desse pré-inóculo para a etapa de fermentação do bagaço de maçã em estado líquido (30 % de bagaço em água destilada). A fermentação se processou a 30° C, durante 6 dias sob aeração constante (Figura 2).

Após este processo, o bagaço fermentado foi pasteurizado. Posteriormente, realizou-se uma segunda fermentação, agora em estado sólido, utilizando um fungo basidiomiceto, *Pleurotus ostreatus var. roseus*.

Os fungos basidiomicetos de degradação branca  $\frac{3}{4}$  aqueles que degradam preferencialmente lignina à celulose  $\frac{3}{4}$  têm sido muito empregados na conversão de lignocelulósicos, pois são bons produtores de lignina peroxidases. Entre eles se destaca *Pleurotus ostreatus*, o qual apresenta um excelente potencial, principalmente por sua comprovada eficiência na degradação de compostos lignocelulósicos (Yamakawa et al. 1992; Gonzales et al. 1993; Yoshida et al. 1993; Ardon et al. 1998; Rodriguez et al. 1999; Bustamante et al. 1999, entre outros), além

de sua rápida colonização de substratos como o bagaço de maçã (Upadhyay e Sohi, 1988; Worrall e Yang, 1992 e da Rosa, 1996). O tratamento com este basidiomiceto é importante, pois a levedura não é capaz de degradar fibras não digeríveis presentes no bagaço como os polímeros de lignina. Dessa forma, *Pleurotus ostreatus* estará aumentando a digestibilidade do substrato, além de também estar contribuindo com suas vitaminas e proteínas.

A cepa de *P. ostreatus var. roseus*



**Figura 2:** Fermentação do bagaço de maçã em estado líquido por *Candida utilis*. 30° C, aeração constante, por 6 dias

de banana (Horn et al. 1988), etc. *Candida utilis* é capaz de hidrolizar as hemiceluloses de resíduos agrícolas (Buchert et al. 1989). Dessa forma, a utilização dessa levedura é importante para diminuir o teor de açúcares simples disponíveis no bagaço e, ao mesmo tempo, aumentar a digestibilidade

(CCT2603) empregada neste estudo foi procedente da coleção de cultura da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Toselo" (Campinas - SP).

Para essa segunda etapa, preparou-se um pré-inóculo de *P. ostreatus var. roseus* em meio MA (Malt Agar). O bagaço de maçã, proveniente da 1ª etapa foi reidratado (80% de umidade), inoculado e incubado à 25° C, durante 30 dias, sob aeração constante (Figura 3).

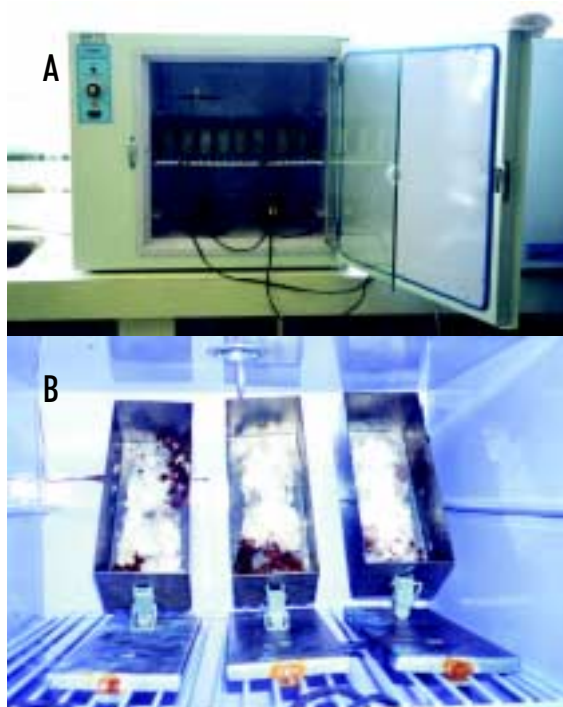
Após este período, o bagaço foi secado em estufa a 50° C e moído. Análises do teor de açúcares redutores totais, pelo método de DNS (Miller, 1959); proteína bruta no substrato, pelo método oficial padrão Kjeldahl (APHA, 1992); lignina Klason (ASTM, 1966) e lignina Klason solúvel (Rocha et al. 1993); teor de cinzas, e teor de ácidos nucléicos totais, a partir do método modificado de Schäffer et al. (1992); foram realizadas ao final de ambos processos.

## Resultados e Conclusões

Durante a fermentação com *Candida utilis*, foi observado um consumo de 80% dos açúcares redutores totais presentes no bagaço inicial (Figura 4). Já após o tratamento com *Pleurotus ostreatus*, observou-se um considerável acréscimo no teor de açúcares redutores, indicando que, possivelmente, esse fungo tenha hidrolizado os polissacarídeos presentes no substrato (Figura 4).

As análises de lignina mostraram que após o tratamento com a levedura houve um aumento no teor desse biopolímero no bagaço de maçã (Figura 5). Isto pode ser devido ao fato da levedura ser capaz de degradar outros biopolímeros presentes no substrato, como a celulose, hemicelulose, amido e pectina, o que provocaria uma alteração no balanço de massa do bagaço, ou seja, aumentaria a proporção em massa de lignina.

Na segunda fermentação, o basidiomiceto degradou, ainda que pouco, a lignina presente no substrato. Já a lignina Klason solúvel caracteriza-se

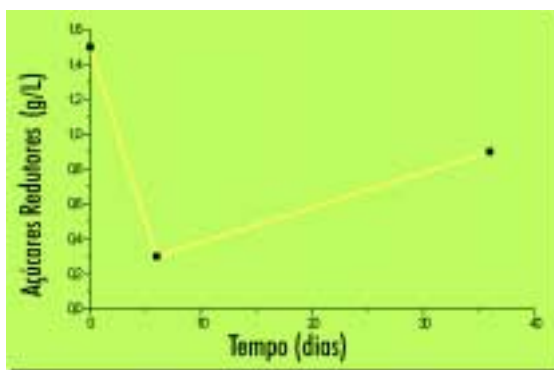


**Figura 3:**

**A:** Fermentação do bagaço de maçã por *Pleurotus ostreatus var. roseus*. Fermentação em estado sólido, 25° C, aeração constante durante 30 dias.

**B:** Bagaço após 30 dias de fermentação em estado sólido. Observa-se praticamente total colonização do substrato pelo fungo

por apresentar-se como fragmentos da cadeia da molécula de lignina que foram quebrados durante a hidrólise ácida, aparecendo na fração solúvel do hidrolizado. Esses fragmentos são porções laterais da cadeia de lignina que se caracterizam por ter baixa massa molar. Eles constituem a parte que primeiramente é atacada pelas enzimas oxidativas na degradação



**Figura 4:** Consumo de açúcares redutores totais durante os diferentes processos fermentativos (Tempo 0-6 dias: *C. utilis*; 7 - 36 dias: *P. ostreatus var. roseus*)

deste polímero e estão geralmente associados a polissacarídeos do tipo celulose e hemicelulose.

A figura 6 relaciona a concentração de lignina Klason solúvel durante os diferentes processos fermentativos e frente aos diferentes organismos. Foi observado que a *Candida utilis*, durante a fermentação, degrada parte dessas cadeias laterais de lignina, de modo que, após a hidrólise, libera-se menor quantidade de fragmentos solúveis.

Já o *Pleurotus ostreatus var. roseus* não se mostrou tão eficiente na degradação desses fragmentos. Apareentemente, esse fungo degrada preferencialmente celulose/hemicelulose, devido ao aumento no teor de açúcares redutores (figura 4). O bagaço de maçã é um substrato rico em açúcares, portanto, enquanto houver fontes de carbono disponíveis, não haverá degradação eficiente da lignina, que é uma macromolécula mais recalcitrante.

A tabela 1 resume os resultados obtidos com relação ao teor de proteína bruta, de cinzas e ácidos nucléicos totais.

O tratamento combinado com os dois fungos proporcionou um enriquecimento, em mais de 100 %, do teor de proteína do resíduo de maçã. Com os tratamentos isolados não foi possível obter tamanho aumento na concentração protéica, embora ambos os organismos sejam capazes de aumentar o teor de proteína.

O teor de cinzas em um substrato representa a disponibilidade de sais minerais disponíveis, ou seja, sais que seriam mais fáceis de serem absorvidos pelos organismos vivos. Nos respectivos tratamentos do bagaço de maçã, também se observou um considerável incremento nesses sais minerais disponíveis. No final dos dois tratamentos biológicos, havia aumentado em mais de 60% o teor de cinzas totais no substrato.

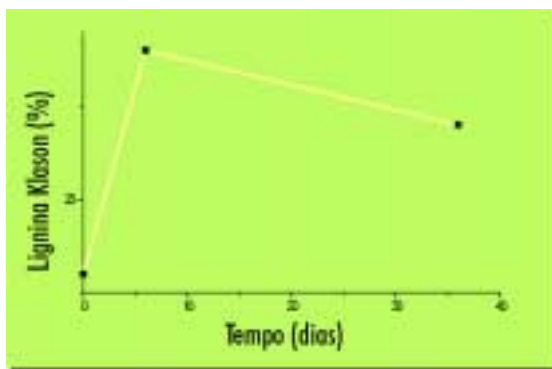
Sinskey e Tannenbaum (1975) publicaram que o teor de ácidos nucléicos associados à produção de SCP era muito alto, comparado aos teores encontrados associados à proteínas convencionais. O consumo de gran-

des quantidades de ácidos nucléicos por seres humanos pode causar um aumento na concentração de ácido úrico no sangue (Sinskey e Batt, 1987). Recomenda-se que o homem consuma no máximo 2 g de ácido nucléico por dia.

Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstra um baixíssimo teor de ácidos nucléicos no substrato após os tratamentos biológicos. Observa-se que não ocorre nenhuma variação considerável durante os diferentes tratamentos, mostrando não constituir este um ponto limitante na utilização deste produto como alimento humano. É importante ressaltar que os animais ruminantes toleram concentrações mais altas desses ácidos, devido à fermentação que ocorre no rúmem.

A figura 7 ilustra a colonização do bagaço de maçã por *Pleurotus ostreatus* var. *roseus*. Durante a fermentação em estado sólido, observou-se um aumento, em cerca de 200%, na biomassa do bagaço.

A figura 8 mostra o aspecto do bagaço moído e seco antes e depois dos tratamentos biológicos. Embora ainda falte realizar as análises de aminoácidos totais, vitaminas, teor de fibras, teor de cálcio, fósforo e potássio, digestibilidade *in vitro*, bem como otimizar os resultados aqui apresentados, já é possível inferir sobre o gran-



**Figura 5:** Variação na concentração de lignina Klason durante ambos os processos fermentativos (Tempo 0-6 dias: *C. utilis*; 7 - 36 dias : *P. ostreatus* var. *roseus*)



**Figura 6**

de potencial que esse produto enriquecido biotecnologicamente apresenta para ser utilizado como alimento, tanto animal como para o próprio homem. O aroma presente no bagaço seco depois das fermentações é muito agradável e nos faz lembrar aroma de nozes.

O produto final poderia, por exemplo, ser empregado como farinha em alimentos humanos, visto que seria uma farinha com alto teor de proteínas, vitaminas e sais minerais. As aplicações para este produto são inúmeras, deste ração animal até alimento direto para o ser humano. Entretanto, ainda não firmamos nenhuma parceria com empresas interessadas em industrializar nosso produto.

### Agradecimentos

Agradecemos a CAPES pelo apoio financeiro e a "FISHER SUCOS IND. E COM. LTDA" pelo fornecimento do bagaço de maçã.

### Referências Bibliográficas

- ADAMOVIĆ, M.; GRUBIĆ, G.; MILENKOVIĆ, I.; JOVANOVIĆ, R.; PROTIC, R.; SRETENOVIĆ, L. & STOICEVIĆ, I.J. (1998). The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Science and Technology* 71: 357-362
- APHA (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (ed. L.S. Clesceri; S.E. Greenberg & R.R. Trussel), 18<sup>th</sup> Ed. *American Public Health Association*, Washington D. C.;

**Tabela 1:** Teores de proteína total; cinzas e ácidos nucléicos totais (DNA + RNA), presentes no bagaço de maçã após diferentes tratamentos

Tratamentos	Proteína Bruta (N x 6,25) %	Cinzas Totais (%)	Ácidos Nucléicos Totais (%)
<b>Controle</b>	<b>4,13</b>	<b>1,98</b>	<b>0,002</b>
<b><i>Candida utilis</i></b>	<b>8,34</b>	<b>2,62</b>	<b>0,003</b>
<b><i>Pleurotus ostreatus</i></b>	<b>5,16</b>	<b>2,35</b>	<b>0,003</b>
<b><i>P. ostreatus</i> + <i>C. utilis</i></b>	<b>10,54</b>	<b>3,23</b>	<b>0,003</b>

**Figura 7:**

**A:** Bagaço de maçã não inoculado (controle) (lupa 6x).

**B:** Bagaço de maçã com crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* var. *roseus* (lupa 6x).

**C:** Bagaço de maçã totalmente colonizado por *Pleurotus ostreatus* var. *roseus* (lupa 6x)



ARAÚJO, A. & SOUZA, J. D. (1985). Enzymatic saccharification of pretreated rice straw and biomass production. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 1503-1509

ARDON, O.; KEREM, Z. & HADAR, Y. (1998). Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Canadian Journal of Microbiology* 44(7): 676-680;

ASTM Methods (1966). D. 1106 – 1156. *Standard test method for lignin in wood*.

BHALLA, T. C. e JOSHI, M. (1994). "Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts". *World Journal and Microbiology and Biotechnology* 10: 116-117;

BONONI, V. L. R. e TRUFEM, S. F. B. (1986). "Cogumelos Comestíveis" In: *Coleção Brasil Agrícola*, Ícone editora 3ª ed.;

BUSTAMANTE, P.; RAMOS, J.; ZUNIGA, V.; SABHARWAL, H.S. &

YOUNG, R.A. (1999). Biomechanical pulping of bagasse with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Pleurotus ostreatus*". *Tappi Journal* 82(6) 123-128;

BUCHERT, J.; PULS, J. & POUTANEN, K. (1989). The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. *Appl. Biochem. Biotech.* 20-1: 309-318;

DA ROSA, E. (1996). Aproveitamento de resíduos agro-industriais do Estado de Santa Catarina no cultivo de fungos comestíveis do gênero *Pleurotus*. Florianópolis (SC), UFSC, 59 pp. Dissertação de Graduação

DURÁN, N. (1989). Bioconversion to single cell protein: Recovery of lignocellulosic materials to produce human food as an integrated process. *Alimentos* 14(4): 39 – 50

FISCHER (1999) <http://www.fischerfraiburgo.com.br/productI.htm>

GAO, P. J.; QU, Y. B.; ZHAO, X.; ZHU, M. T. & DUAN, Y. C. (1997). Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. *Enzyme and Microbial Technology* 20 (8): 581-584

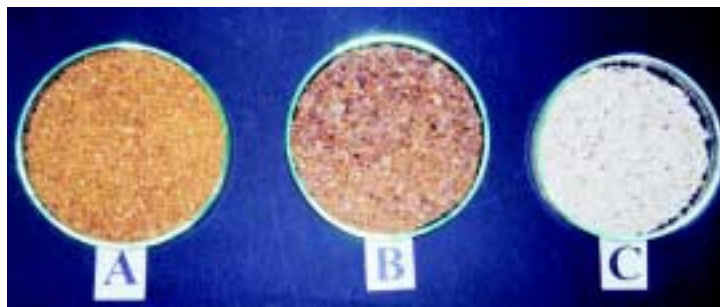
GONZÁLEZ, T. B.; ROSALES, M. S. D. & BALTAZAR, S. A. B. (1993). Cultivo

de hongo comestible *Pleurotus ostreatus* var. *florida* sobre fibra de coco y pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología* 9: 13-18

HORN, C. H.; DU PREEZ, J. C. & LATEGAN, P. M. (1988). Protein enrichment of banana plant wastes by yeast cultivation. *Biological Wastes* 24: 127-136

JALC, D.; NERUD, F.; ZITNAN, R. & SIROKA, P. (1996). The effect of white-rot basidiomycetes on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Folia Microbiologica* 41(1): 73-75

JOSHI, V. K.; JAISWAL, S. e KAUSHAL, B. B. L. (1998). "Apple pomace:



**Figura 8:** Esta figura mostra a aparência do bagaço de maçã moído, antes e depois dos diferentes tratamentos biológicos. A: Bagaço sem tratamento; B: Bagaço após fermentação com *Candida utilis*; C: Bagaço após fermentação com *Pleurotus ostreatus* var. *roseus*

Effect of sulphur dioxide and temperature on its preservation and medium optimization for yeast biomass production". *Journal Scientist Industry Research* 57(10-11) 692-697;

MILLER, G. L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426 – 428

NIGAM, J. N. (1998). Single cell protein from pineapple cannery effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (5): 693-696

RAHMAT, H.; HODGE, R. A.; MANDERSON, G. J. e YU, P. L. (1995). "Solid-Substrate fermentation of *Kluyveromyces fragilis* and *Candida utilis* on apple pomace to produce an improved stock-feed". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(2): 168-170;

ROBERTO, I. C.; DE MANCILHA, I. M. & SATO, S. (1999). Kinetics of xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* crown on rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77-9: 205-210

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T. & SCHUCHARDT, U. (1993). Improvement of a rapid UV spectrophotometric method for determination of lignin in alkaline solutions. *3th. Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Wood Components*. Belo Horizonte, MG, Setembro 8 – 10, Programe and Abstracts, p. 73

RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M.A. & VAZQUEZ-DUHALT, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 3(1): 27-32;

SCERRA, V.; CARIDI, A.; FOTI, F. & SINATRA, M. C. (1999). Influence of dairy *Penicillium* spp. on nutrient content of citrus fruit peel. *Animal Feed Science and Tecnology* 78 (1-2): 169-176

TENTRATIAN, S. & FIELDS, M. L. (1990). Enrichment of ground corn cobs with cellulolytic microorganisms. *Biological Wastes* 34: 123-131

UPADHYAY, R. C. e SOHI, H. S. (1988). "Apple pomace - A good substrate for the cultivation of edible mushrooms". *Current Science* 57: 1189-1190;

WORRALL, J. J. e YANG, C. S. (1992). "Shiitake and oyster mushroom production on apple pomace and sawdust". *Hortscience* 27: 1131-1133;

YAMAKAWA, M.; ABE, H. & OKAMOTO, M. (1992). Effect of incubation with edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on voluntary intake and digestibility of rice straw by sheep. *Animal Sci. Technol.* 63(2): 129-133;

YOSHIDA, N.; TAKAHASHI, T.; NAGAO, T. & CHEN, J. (1993). Effect of edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation on *in vitro* digestibility of wheat straw and sawdust substrate. *Journal of Japanese Soc. of Glassland Sci.* 39(2):177-182;

ZHENG, Z. e SHETTY, K. (1998). "Solid-state production of beneficial fungi on apple processing wastes using glucosamine as the indicator of growth". *Journal of Agriculture Food Chemistry* 46: 783-787.