

ENRIQUECIMENTO PROTÉICO DE PEDÚNCULOS DE CAJU COM EMPREGO DE LEVEDURAS, PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL¹

JOSÉ SIMPLÍCIO DE HOLANDA², ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA³ e ANTONIO CARLOS FERREIRA⁴

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo identificar a porcentagem de inóculo e tempo de fermentação adequados para promover o enriquecimento protéico de pedúnculos de caju, por meio do desenvolvimento de leveduras. Utilizou-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae* com inoculação de até 10% na pasta de caju (base úmida) e períodos de fermentação de até 72 horas. Com 10% de inóculo foram obtidos teores de proteína acima de 20% (base seca) no caju fermentado, porém o ganho líquido protéico foi menor do que no caju com 5% de inóculo. Concluiu-se que o tempo necessário para fermentação do caju é inferior a 24 horas; que a melhor porcentagem de inóculo foi a de 5%; e que o emprego de levedura na fermentação do caju viabiliza a obtenção de um concentrado protéico similar à torta de algodão.

Termos para indexação: bovinos, ração, fermentação, nutrição animal.

PROTEIN ENRICHMENT OF CASHEW WASTE WITH YEAST FOR ANIMAL ALIMENTATION

ABSTRACT - The objective of this research was to identify the best ratio of yeast inoculum on the cashew waste, and also to determine the adequate period of yeast fermentation to achieve a reasonable protein content. The yeast species used was *Saccharomyces cerevisiae* up to 10% inoculation on cashew pulp (on the basis of fresh weight) and the fermentation up to 72 hour. Protein concentration higher than 20% (dry weight basis) was attained with yeast inoculum of 10% on the cashew pulp but the proteic net yield was lower than 5% of the yeast inoculum on cashew pulp. The best treatment was a fermentation time lower than 24 hour and yeast inoculum ratio of 5%. It is concluded that yeast fermentation of cashew pulp permits to obtain a proteic ration similar to cotton cake.

Index terms: beef production, animal feed, fermentation, yeast inoculum.

¹ Aceito para publicação em 16 de julho de 1997.

² Eng. Agr., D.Sc., Embrapa/EMPARN, Rua Major Laurentino de Morais, 1220, Caixa Postal 188, CEP 59020-390 Natal, RN.

³ Eng. Agr., D.Sc., Dep. de Ciência e Tecnol. Agroindustrial, ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP.

⁴ Lic. Química Industrial, Dep. de Solos, ESALQ/USP.

INTRODUÇÃO

Os seres vivos para sobreviverem necessitam de proteína em sua dieta alimentar. Considerando um requerimento protéico médio de 40 g/dia/pessoa, estima-se que o consumo anual de proteína pela população brasileira situa-se próximo a 2,3 milhões de toneladas.

A principal proteína animal consumida no Brasil é de origem bovina, representando cerca de 51% do total. A produção anual de carne bovina no Brasil é da ordem de 5 milhões de toneladas, mas para atendimento da necessidade protéica da população brasileira essa produção teria de ser aproximadamente o dobro (Silveira, 1994).

A produção de pedúnculos de caju no Brasil é estimada em torno de 1 milhão de toneladas/ano, concentrando-se basicamente na Região Nordeste e com aproveitamento industrial, conforme Lopes Neto citado por Telles (1988), de apenas 2 a 6% do total. A quantidade desperdiçada (94 a 98%) representa um elevado potencial de uso para conversão protéica por microorganismos, pois, contendo menos de 7% de proteína (base seca), na sua composição existe cerca de 10% de carboidratos (açúcar e amido) que podem ser metabolizados como fonte de energia para reações de biossíntese. O desperdício de pedúnculos de caju na Região Nordeste é superior a 940 mil toneladas/ano, que enriquecido em proteína poderá ser importante alternativa para ração animal.

Entre os organismos processadores de proteína destacam-se as leveduras, pela alta eficiência na conversão, presentes na nutrição humana desde a pré-história. King, citado por Pepler (1970), afirma que na nutrição humana as leveduras foram cedo reconhecidas como fonte protéica de valor e uma grande reserva natural de vitaminas do complexo B, com valores nutritivos, em termos de digestibilidade e valor biológico, em torno de 87%, relativamente altos quando comparados aos totais do ovo de galinha, da ordem de 96%.

Segundo Park & Ramirez (1989), as leveduras de panificação são organismos atrativos para produção comercial de proteína em virtude da fácil propagação fermentativa e de não terem relação patogênica com o homem. Tal produção de proteína é similar à dos organismos superiores.

Conforme Pandey (1992), 2.600 anos antes de Cristo os egípcios já dominavam a tecnologia de fabricação de pães. Pasteur há mais de um século conseguiu caracterizar a individualidade da levedura como um organismo vivo com características próprias, decifrando sua atuação na transformação de açúcares. Todavia, foi na década de 1940 a 1950 que ocorreu um alto desenvolvimento da fermentação industrial, com a produção da penicilina. A *Saccharomyces cerevisiae* foi a primeira levedura utilizada pelo homem e é a mais intensamente cultivada.

No Brasil são raras as pesquisas nessa área da tecnologia de alimentos, enquanto na Rússia, o país onde mais rápida evolução ocorreu, a produção de levedura, já em 1990, era estimada em cerca de 2 milhões de toneladas do produto seco, destinada à alimentação animal (Peppler, 1970).

A eficiência da conversão protéica por leveduras depende de fatores como temperatura, suprimento de oxigênio e disponibilidade de nutrientes (Burrows, 1970) e o tempo médio para dobrar o teor de proteína é de 5 horas em sistema de fermentação por batelada (Worgan, 1973). Diversos produtos têm sido usados com sucesso para processamento protéico por fermentação microbiana: resíduos de batata-doce (Yang, 1988); bagaço de laranja (Menezes et al., 1989); resíduos de mandioca (Canoilas, 1991; Manilal et al., 1991) e beterraba forrageira (Gibbons et al., 1984). No entanto, Yang (1988) sugere que, para ser economicamente viável e competitiva, a bioconversão protéica tem de ser processada no meio rural.

Este trabalho teve como objetivos avaliar a proporção de inóculo de levedura e o tempo de fermentação necessários para elevar o teor protéico na pasta de pedúnculos de caju, a um nível equiparável ao da torta de algodão.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido com pedúnculos de caju, em laboratório do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da USP-ESALQ, no período março/abril de 1994, e constou da adição de diferentes proporções de levedura à massa de pedúnculos de caju, com determinações de proteína bruta em diferentes intervalos de tempo. As proporções de levedura adicionadas compreenderam: 2,5, 5,0 e 10,0% (base úmida); e os períodos de fermentação utilizados foram: zero (após a homogeneização da mistura), 24, 48 e 72 horas.

A fermentação empregada foi do tipo submersa em sistema de batelada, com agitações esporádicas para facilitar a oxigenação. A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*, cuja análise revelou 46% de proteína bruta (base seca) e 70% de umidade.

Considerando que os pedúnculos de caju frescos apresentavam uma porcentagem de matéria seca aproximada de 15% e que o fermento (levedura) empregado continha cerca de 30% de matéria seca, as porcentagens de inóculo adicionadas corresponderam ao dobro da descrita, em base seca.

Para cada porcentagem de levedura adicionada foi obedecida a seqüência: pesado 600 g de pedúnculo de caju fresco, triturado em liquificador por cinco minutos, coletada amostra para determinação de proteína na massa ao natural, inoculação da levedura no meio pastoso, sem adição de nutrientes e novamente triturado em liquificador, para homogeneização da pasta. O material foi posto em bandejas retangulares de alumínio formando uma camada de aproximadamente 2 cm de espessura e colocadas em estufa com temperatura regulada em $35 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Nos períodos de fermentação previstos foram coletadas amostras e transferidas para estufa a 65°C até peso constante, para determinação de nitrogênio total em quatro repetições para cada tempo. O N-total foi determinado pelo método semimicro Kjeldahl descrito por Tedesco et al. (1985).

O nitrogênio contido no meio fermentativo teve como fonte somente o substrato e inóculos utilizados. Em teste de extração com KCl 1N não foi confirmada a presença de N-solúvel ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$), correspondendo portanto o N-total a N-orgânico.

O teor de proteína bruta dos tratamentos foi obtido multiplicando-se o N-total pelo fator 6,25. Ao término do ensaio foi feita análise química de nutrientes totais nas pastas de pedúnculos de caju.

Avaliou-se o ganho líquido protéico com base nas porcentagens de proteína bruta e de matéria seca dos tratamentos nos tempos zero e 24 horas de fermentação e numa estimativa da água produzida nas reações metabólicas.

Decorridas 24 horas de fermentação, as pastas de pedúnculos com 5,0% e 10,0% de levedura foram amostradas e diluídas 100 vezes para avaliação populacional.

A composição protéica e de nutrientes totais nas pastas de caju foram comparadas com os mesmos parâmetros contidos em amostra de torta de algodão. A torta de algodão foi usada como padrão de referência por ser a ração concentrada preferida pelos pequenos criadores do Nordeste, tanto para engorda como para a produção de leite.

Os resultados de proteína bruta em cada proporção de levedura foram submetidas à análise de variância com teste F ($P < 0,05$) e em seguida feito o contraste das médias pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteína na massa seca de pedúnculos de caju fermentados teve um valor médio aproximado de 2, 2,5 e 3,5 vezes, respectivamente, nos inóculos de 2,5, 5,0 e 10,0%, quando comparada com a pasta natural de caju. Em termos médios, o teor de proteína guardou uma boa proporção de aumento entre as porcentagens de inóculo de levedura: cerca de 3,36% de proteína entre 2,5 e 5,0% de inóculo, e 6,65% de proteína entre 5,0 e 10,0% de inoculação (Tabela 1).

TABELA 1. Proteína bruta e matéria seca em pastas de pedúnculos de caju com diferentes proporções de inóculo de levedura, após diversos períodos de fermentação. Médias de 4 repetições, Piracicaba, SP, 1994¹.

| Tempo de fermentação | Inóculo: leveduras (%) | | | | | |
|----------------------|--|-------|-------|----------------------------|------|------|
| | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 |
| |Proteína bruta (% base seca) ² | | |Matéria seca (%)..... | | |
| Zero | 8,06 | 10,87 | 21,48 | 14,0 | 11,9 | 10,0 |
| 24 horas | 14,78 | 18,11 | 22,48 | 8,0 | 8,6 | 9,7 |
| 48 horas | 14,69 | 17,24 | 23,80 | 8,7 | 9,3 | 9,6 |
| 72 horas | 14,39 | 19,15 | 24,22 | 11,9 | 9,9 | 12,7 |
| Médias | 12,98 | 16,34 | 22,99 | - | - | - |
| C.V. (%) | 6,0 | 3,1 | 5,0 | - | - | - |
| d.m.s. (5%) | 1,63 | 1,07 | 2,40 | - | - | - |

¹ Condições de fermentação: temperatura $35 \pm 1^\circ\text{C}$; número de células por grama de substrato igual a $3,5 \times 10^8$, $7,0 \times 10^8$ e $1,4 \times 10^9$ respectivamente para 2,5%, 5,0% e 10,0% de inóculo.

² Para efeito comparativo, torta de algodão comercializada em 1992 na zona oeste e seridó do Rio Grande do Norte apresentou 19,38% de proteína bruta; pedúnculo natural de caju, utilizado neste trabalho apresentou 6,58% de proteína bruta.

Como não foi adicionado nitrogênio inorgânico nos tratamentos, o aumento do percentual de N-protéico encontrado se justifica pela diminuição da matéria seca na conversão do substrato em produto quando parte do carbono é perdido na forma de CO_2 . Pasteur, citado por Burrows (1970), observou que na fermentação da glicose em meio aeróbico, metade do carbono é oxidado a CO_2 no fornecimento de energia para o crescimento e a outra metade é convertida em material celular.

As pastas de pedúnculos de caju em fermentação apresentaram, numa primeira fase, uma redução da matéria seca seguida de aumento no final (Tabela 1). A redução da matéria seca na primeira fase se justifica pelos produtos da reação do metabolismo da levedura quando da quebra de carboidratos, resultando em perdas de carbono na forma de CO_2 , massa celular e água. O aumento final da matéria seca, na realidade, corresponde à diminuição da umidade nas pastas, em decorrência da evaporação da água após a fermentação.

A produção de água durante a fermentação foi estimada em 3,21 g por 100 g de pasta úmida, considerando que todo o açúcar contido na pasta foi metabolizado. Esse valor foi utilizado na correção do ganho líquido protéico, calculado em 6,7, 27,0 e 10,4 g por kg de massa seca de pedúnculo de caju, respectivamente nas misturas de 2,5, 5,0 e 10,0% de levedura inoculada. Isso evidencia que embora o teor de proteína na massa fermentada com 10,0% de levedura seja superior ao da massa com 5,0% de inoculação, em termos de ganho líquido de proteína, a última proporção de inóculo foi bem mais expressiva. Esses valores, no entanto, não são comparáveis aos obtidos por Menezes et al. (1989), entre 50,8 e 53,7 g de proteína por kg de massa seca de bagaço de laranja, por se tratar de meio sem suplementação mineral e substrato, microorganismo e tipo de fermentação diferentes.

O objetivo pretendido foi atingido tanto com a inoculação de 5,0% de levedura como com a de 10,0% de levedura, pela obtenção de teores de proteína equiparáveis e até superiores aos da torta de algodão.

Quanto ao tempo de fermentação, o teor de proteína nas duas primeiras proporções de inóculo foi menor no tempo inicial, não diferindo nos demais períodos em 2,5% de inóculo; a fermentação por 24 horas com 5,0% de inóculo de levedura apresentou um teor de proteína igual ao de 48 e 72 horas, sendo este por sua vez superior ao de 48 horas. Com 10,0% de inóculo, o teor de proteína no tempo inicial de fermentação só foi inferior ao de 72 horas, e este não diferiu do de 24 horas nem do de 48 horas (Tabela 1). Tal comportamento, com tendência a não diferir o teor de proteína no tempo de fermentação à medida que se aumenta a proporção

de inóculo de levedura, induz a se admitir que o tempo necessário para completa degradação dos carboidratos no caju, por *Saccharomyces cerevisiae*, é inferior a 24 horas. A esse respeito Worgan (1973) afirma que o tempo médio para a proteína dobrar, no meio de cultivo com suficiente substrato e sob condições favoráveis, é de cerca de cinco horas em sistema de fermentação por batelada. Com base nessa informação, nos resultados obtidos e no teor inicial de proteína no pedúnculo de caju é de se esperar que em aproximadamente oito horas a concentração protéica desejada seja atingida.

As inoculações de 5,0 e 10,0% de levedura proporcionaram teores de proteína na massa seca de caju similares aos obtidos por Manilal et al. (1991) e Gibbons et al. (1984), em torno de 20% de proteína nas fermentações de amido de mandioca e beterraba forrageira, respectivamente, com a vantagem de ser em tempo mais reduzido, menos de 24 horas, enquanto os autores referidos conseguiram eficiente conversão entre 28 e 48 horas. Comparada a fermentação de resíduos de batata-doce por *Saccharomyces* sp. efetuada por Yang (1988), que obteve no máximo 14% de proteína, ou a fermentação de resíduos de farinha de mandioca por *Candida sorboxylosa* realizada por Canoilas (1991) obtendo 3,0% de proteína, os resultados deste trabalho foram bem mais promissores. As diferenças tanto no período de fermentação quanto nos valores obtidos de proteína podem ser atribuídas à facilidade de degradação dos carboidratos contidos no caju. Açúcares como glicose e frutose são incorporados diretamente na via glicolítica do metabolismo da levedura.

A avaliação da população de leveduras (Tabela 2) mostrou que após 24 horas de fermentação o número de células vivas/mL com 5,0% de inóculo foi 4,5 vezes superior ao com 10,0%. Neste último tratamento, embora tenha apresentado quase 12% de brotação, o percentual de células mortas aproximou-se de 19%. A causa da mais alta mortalidade de células no material com 10,0% de inóculo provavelmente está associada à limitação dos carboidratos disponíveis, logo metabolizado pela elevada densidade de população inicial de levedura. Atenção deve ser dada ao pH nas massas de caju em fermentação que, ao acentuar-se (pH < 3,5), poderá causar prejuízo e conseqüente redução da eficiência de conversão protéica da levedura, embora o elevado índice de acidez previna a contaminação do meio por microorganismos como bactérias.

TABELA 2. Avaliação da população de células de leveduras e da acidez do meio, após 24 horas de fermentação das pastas de pedúnculos de caju.

| Identificação | Levedura pura | Inóculo: levedura (%) | |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 10,0 | 5,0 |
| Células vivas (N ^o /mL) | 1,4 x 10 ¹⁰ | 1,4 x 10 ⁸ | 6,3 x 10 ⁸ |
| Células viáveis (%) | 98,4 | 81,4 | 89,1 |
| Células mortas (%) | 1,6 | 18,6 | 10,9 |
| Brotação (%) | 0,3 | 11,8 | 2,2 |
| Acidez (pH) | - | 3,6 | 3,6 |

Analisando-se a composição de nutrientes nas massas de caju (Tabela 3) e comparando-a com o padrão de referência da torta de algodão observa-se que com a inoculação de levedura os teores de nitrogênio e potássio se elevaram para níveis compatíveis aos da ração comercial, continuando porém inferiores às concentrações de fósforo, cálcio e magnésio. Os teores de nitrogênio e fósforo no meio fermentativo estão entre os principais fatores que influem no rendimento e propriedades da levedura, conforme frisa Burrows (1970). Sem a adição de sais minerais, na fermentação de bagaço de laranja por fungos (*Aspergillus* e *Rhizopus*), Menezes et al. (1989) não conseguiram otimizar o rendimento protéico. Como no meio de cultivo não foi adicionado nenhum nutriente pressupõe-se que com uma suplementação mineral na própria massa de caju a ser fermentada poder-se-á obter um produto equiparável à torta de algodão, que poderá se constituir num futuro próximo numa importante alternativa de fonte protéica para arraçoamento animal.

TABELA 3. Composição de nutrientes totais nas pastas de pedúnculos de caju seco, para diferentes proporções de levedura inoculada e após 24 horas de fermentação¹.

| Identificação | Nutrientes totais (% matéria seca) | | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|------|------|------|------|------|
| | N | P | K | Ca | Mg | S |
| Caju natural | 1,05 | 0,08 | 1,06 | 0,08 | 0,06 | 0,10 |
| 2,5% levedura | 2,34 | 0,19 | 1,68 | 0,08 | 0,11 | 0,16 |
| 5,0% levedura | 2,91 | 0,27 | 1,63 | 0,08 | 0,12 | 0,20 |
| 10,0% levedura | 3,68 | 0,45 | 1,91 | 0,09 | 0,14 | 0,25 |
| Torta de algodão ² | 3,10 | 0,60 | 1,43 | 0,31 | 0,32 | - |

¹ Fermentação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e n° de células por grama de substrato no tempo zero de $3,5 \times 10^8$; $7,0 \times 10^8$ e $1,4 \times 10^9$, respectivamente para 2,5%; 5,0% e 10,0% de inóculo.

² Ração comercializada em 1992 na zona oeste e seridó do Rio Grande do Norte.

A economicidade da bioconversão protéica está na dependência de vários fatores: o processamento no campo para torná-la viável como sugere Yang (1988) influi, principalmente, na redução de custos de transporte. Dependendo da proporção de inóculo de levedura utilizada esse fator pode assumir custos relevantes no sistema de produção, tendo em vista que o preço do fermento no comércio é de aproximadamente R\$ 14,70/kg (base seca). Entretanto, o custo referente à aquisição do inóculo pode ser diluído em vários ciclos fermentativos, com os seguintes sendo abastecidos pela produção dos anteriores. No caso do enriquecimento protéico do pedúnculo de caju pela fermentação em sistema de batelada, testes posteriores mostraram uma acentuada queda no teor de proteína no ciclo de fermentação seguinte, levando a sugerir que as pesquisas com esse substrato devem ser direcionadas para o sistema de fermentação contínua.

CONCLUSÕES

1. A proporção de 10,0% de inóculo de levedura na massa de pedúnculos de caju proporciona um teor protéico acima de 20% no material fermentado.
2. A fermentação da massa de pedúnculos de caju com 5,0% de inóculo de levedura é a de melhor desempenho.
3. O maior ganho líquido protéico e a maior população final de células viáveis de levedura são obtidas com 5,0% de inóculo.
4. O tempo de fermentação necessário para conversão protéica dos carboidratos do pedúnculo de caju é inferior a 24 horas.
5. O emprego de levedura na fermentação de pedúnculos de caju viabiliza a obtenção de um concentrado protéico, similar à torta de algodão, como fonte alternativa de alto potencial para o arraçamento animal.

REFERÊNCIAS

- BURROWS, S. Baker's yeast. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds.). **The Yeasts: Yeast technology**. London: Academic Press, 1970. v.3, p.349-419.
- CANOILAS, L.M. **Enriquecimento protéico de resíduos de farinha de mandioca pelo desenvolvimento de leveduras**. Piracicaba: ESALQ, 1991. 110p. Tese de Mestrado.
- GIBBONS, W.R.; WESTBY, C.A.; DOBBS, T.L. A continuous, farm-scale, solid-phase fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from fodder beets. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.1098-1107, 1984.
- MANILAL, V.B.; NARAYANAN, C.S.; BALAGOPALAN, C. Cassava starch effluent treatment with concomitant scp production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.7, p.185-190, 1991.

- MENEZES, T.J.B.; SALVA, J.G.; BALDINI, V.L.; PAPINI, R.S.; SALES, A.M. Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, London, p.167-171, Oct. 1989.
- PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v.27, p.109-117, 1992.
- PARK, S.; RAMIREZ, W.F. Dynamics of foreign protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.33, p.272-281, 1989.
- PEPLER, H.J. Food yeasts. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Eds.). **The Yeasts: Yeast technology**. London: Academic Press, 1970. v.3, p.421-462.
- SILVEIRA, E.C. Carne bovina: a preferida dos brasileiros. **Folha da Embrapa**, Brasília, v.3, n.16, p.8, out. 1994.
- TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1985. 188p. (Boletim Técnico, 5).
- TELLES, P.R.S. Industrialização do pseudofruto e da castanha. In: LIMA, V.P.M.S. (Org.). **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1988. p.357-402.
- WORGAN, J.T. Protein production by microorganisms from carbohydrate substrates. In: JONES, J.G.W. (Ed.). **The biological efficiency of protein production**. Cambridge: Univ. Press, 1973. p.339-371.
- YANG, S.S. Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.32, p.886-890, 1988.