

Utilização da casca do fruto do cacau para a produção de proteína microbiana¹

Ismael Maciel de Mancilha², Magdala Alencar Teixeira²,
Alonso Salustiano Pereira² e Alcides Reis Conde³

Resumo

Cultivaram-se *Cellulomonas flavigena* e *Alcaligenes faecalis* em casca de frutos do cacau nas concentrações de 3,0; 5,0; 7,5 g/l e períodos de fermentação de 65, 70, 75, 80 e 85 horas. Foram estabelecidas equações de regressão para a percentagem de proteína bruta (PB) e para o teor de matéria seca (MS) no material fermentado. Encontrou-se melhor desenvolvimento dos microrganismos e, conseqüentemente, maior rendimento em PB (63,79%) na MS na concentração de 3,0 g/l de casca, após 80 horas de fermentação. O teor de MS variou de 1,934 a 7,040 g/l, respectivamente, para a concentração de 3,0 g/l de casca com tempo de fermentação de 85 horas e para 7,5 g/l de casca com o tempo de fermentação de 65 horas.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, fruto, casca, proteína microbiana, *Cellulomonas flavigena*, *Alcaligenes faecalis*.

Utilization of cacao pod husk as substrate for single cell protein production

Abstract

Cellulomonas flavigena and *Alcaligenes faecalis* were grown in a medium containing cacao pod husk as the sole source of carbon with concentrations of 3.0, 5.0 and 7.5 g/l and fermentation times of 65, 70, 75, 80 and 85 hours. Regressions were established for the values of total protein (TP) and dry matter (DM). A yield of 63.79% (dry basis) of TP obtained at cacao pod husk concentration of 3.0 g/l after 80 hours of fermentation was found to be the best development condition for the microorganisms. The values of DM obtained varied from 1.934 to 7.040 g/l at cacao pod husk concentration of 3.0 g/l after 85 hours of fermentation and 7.5 g/l after 65 hours of fermentation respectively.

Key words: *Theobroma cacao*, fruit, husk, single cell protein, *Cellulomonas flavigena*, *Alcaligenes faecalis*.

¹ Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa (UFV), como um dos requisitos para obtenção de grau de "Magister Scientiae" em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

² Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), UFV, 36570. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Matemática (DMA), UFV.

Introdução

A carência de alimentos, especialmente a carência protéica, constitui sério problema decorrente da explosão demográfica (Han, Dunlap e Callihan, 1971). As necessidades mínimas **per capita** só poderão ser satisfeitas caso se empreguem meios tecnológicos adequados no sentido de se aumentar a produção de proteínas, explorando convenientemente as fontes animais e vegetais atualmente disponíveis e abrindo novas perspectivas, principalmente no que se refere à biossíntese de proteínas por microorganismos.

Durante os últimos anos, pesquisas têm sido realizadas no sentido de solucionar a deficiência protéica mundial, com o surgimento de muitos alimentos não convencionais (Han, Dunlap e Callihan, 1971). Atenção especial vem merecendo a produção de proteína microbiana, também chamada "single-cell protein", proteína unicelular.

Segundo Rols e Cabrera (1978), a proteína contida nos microorganismos ou proteína microbiana é, dentre as fontes protéicas não tradicionais, a que apresenta maior potencial relativamente à sua produção e à incorporação em concentrados para animais e em formulações de alimentos humanos. Tais proteínas são derivadas de células de leveduras, fungos, bactérias e algas, com a utilização de vários substratos, tais como hidrocarbonetos e resíduos celulósicos, para o cultivo desses microorganismos (Han, Dunlap e Callihan, 1971).

As atividades agropecuárias geram uma quantidade apreciável de subpro-

duetos que, em princípio, poderiam ser utilizados como substrato para o crescimento de microorganismos, com a finalidade de se produzir proteína microbiana.

Menezes, Duchini e Figueiredo (1976) investigaram a produção de biomassa fúngica em substratos de bagaço de cana mediante o emprego de diversas espécies de fungos celulolíticos, com a finalidade de selecionar os mais produtivos. Jarl (1969), utilizando *Candida utilis* ("Torula yeast"), em simbiose com uma espécie de levedura que produz amilase, *Endomycopsis fibuliger*, utilizando resíduos de batata como matéria-prima, com o objetivo de converter o amido até uma massa de levedura, conseguiu um produto com 40% de proteína bruta (PB) na matéria seca (MS). Utilizando *Saccharomyces fragilis* como microorganismo fermentador de lactose de soro de queijo, Vananuvat (1973) obteve um rendimento de 5,91 g de PB na MS, por litro de meio, sendo que o teor de PB de levedura variou de 52 a 60%.

A produção brasileira de cacau em amêndoas foi de 318.400 t no ano de 1982 (Anuário Estatístico do Brasil, 1982). Baseando-se na relação entre o peso das sementes e o das cascas, que é de 1,0:0,7 (Llamosas, 1976), conclui-se que aproximadamente 222.800 t de cascas são desperdiçadas anualmente.

Em estudo realizado por Brandão e Tafani (1976), com 1500 frutos de cacau, o peso dos componentes foi o seguinte; casca 563 kg, amêndoas 138,3 kg, mel 1,8 kg, perdas (mel e detritos de casca) 4,0 kg, obtendo-se

um peso total de frutos de 707,8 kg e concluindo-se que o peso da casca obtido corresponde a 79,6% do peso total dos frutos.

O aproveitamento da casca do fruto de cacau tem sido permanentemente cogitado. Llamosas, Pereira e Soares (1983) estudaram a utilização da casca fresca como substituto do capim-elefante no acabamento de novilhos em confinamento. Os autores concluíram que os ganhos médios de peso vivo dos novilhos, alimentados com rações nas quais o capim foi gradativamente substituído pela casca até atingir os 100% não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Concluíram também que não ocorrem diferenças significativas para o consumo diário de MS, o que evidenciou a boa aceitação da casca fresca.

De Alba e Basadre (1952) conduziram experimentos com porcos em regime de engorda utilizando rações à base de casca de cacau, milho e bananas e não encontraram diferenças significativas nos ganhos de peso dos animais com quaisquer das rações utilizadas.

Outros trabalhos têm sido conduzidos com a casca do fruto do cacau para a alimentação de vacas leiteiras (De Alba et al., 1954); gado em regime de engorda (Ferrão, 1957; Adeyanju et al., 1981); galinhas (Adeyanju et al., 1975) e fabricação de geléia (Borges, 1971).

Além dessas aplicações, outras sugestões foram feitas por Greenwood-Barton (1965) no sentido de se utilizar a casca de cacau na fabricação de papel, fertilizantes, furfural e pectina.

Segundo Campêlo e Luz (1981), grande quantidade de casca de cacau é normalmente deixada no campo, onde se constitui em uma excelente fonte de inóculo do agente etiológico da podridão-parda (*Phytophthora* spp.). Considerando-se estes fatos e a carência de proteínas que o mundo enfrenta, foi efetuado o presente trabalho, que teve por objetivo estudar a utilização da casca do fruto do cacau como substrato para o desenvolvimento de microrganismos e conseqüente produção de proteína microbiana.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se como matéria-prima casca de fruto do cacau fornecida pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Ilhéus, BA.

Microrganismos e sua manutenção.

No presente experimento, foram utilizadas culturas de *Cellulomonas flavigena*, obtidas através de reembolso postal da "American Type Culture Collection" (ATCC), sob n.º 482, e de *Alcaligenes faecalis*, fornecida pelo Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP. As culturas foram repicadas a cada 15 dias, em caldo nutritivo, contendo tripton, glucose e extrato de levedura, incubadas a 30 °C e mantidas a 5 °C.

Preparo da matéria-prima. As cascas foram reduzidas a pedaços menores e colocadas em estufas a 55 °C ± 2 °C,

para secagem, até o ponto de moagem. Foram passadas por moinho e peneiras de 0,50 mm de abertura, sendo estocadas em sacos de polietileno até o momento da utilização. Após o preparo, a casca moída foi submetida a um tratamento térmico-cáustico, adicionando-se, para cada 10 g de casca, 20 ml de uma solução de NaOH 0,56 N e autoclavando-se a 121 °C durante 10 minutos (Menezes, Duchini e Figueiredo, 1976; Han, Dunlap e Callihan, 1971).

Preparo do meio líquido de fermentação. O meio líquido de fermentação foi preparado a pH 7,0, variando-se apenas a concentração de casca pré-tratada (3,0; 5,0 e 7,5 gramas de casca por litro de meio) e adicionando-se sulfato de amônia na concentração de 1,0 g/l como fonte inicial de N. Após o preparo, o meio foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

Produção de proteína microbiana. O processo descontínuo de produção de proteína microbiana foi conduzido em fermentador de aço inoxidável e com capacidade de 5,0 litros, provido de aeração e agitação, construído pela Metalúrgica BIASINOX Indústria e Comércio Ltda., Lambari, MG. Ao meio de fermentação, contendo 3,0; 5,0 e 7,5 gramas de casca pré-tratada por litro de meio, foi adicionado, ao nível de 1%, uma suspensão de células, resultante da mistura (1:1 v/v) de *C. flavigena* e *A. faecalis*. Manteve-se a temperatura de 30 °C, aeração de 1 v/v/m (volume de ar por volume de meio por minuto) e agitação de 170 rpm. Após 65, 70, 75, 80 e 85 horas de fermentação, o material foi amostrado

e submetido às análises.

Análise química do material fermentado. A casca fermentada foi submetida a análise de PB pelo método n.º 4.12 – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976). O teor de MS (g/l) foi determinado conforme método 29.1.6 – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976).

Análise dos resultados. Os efeitos de concentração de casca e seu tempo de fermentação sobre os teores de PB e MS foram estudados através do modelo: $\hat{Y}_i = b_0 + b_1X_{1i} + b_2X_{2i} + b_3X_{1i}X_{2i} + b_4X_{1i}^2 + b_5X_{2i}^2 + e_j$, onde:

\hat{Y}_i = média de quatro observações dos teores de PB e MS;

X_{1i} = concentração (3,0; 5,0 e 7,5 g/l) de casca de cacau;

X_{2i} = Tempo de fermentação (65, 70, 75, 80 e 85 horas);

b_0 = Constante de regressão;

b_j = Coeficiente de regressão ($j = 1, 2, 3, 4$ e 5);

e_1 = Erro aleatório, pressuposto normal e independentemente distribuído, com média 0 (zero) e variância constante.

Resultados e Discussão

Os valores obtidos para PB e MS são mostrados no Quadro 1.

Proteína bruta. A equação ajustada para a percentagem de PB foi: $\hat{Y} = -29,5216.10 - 15,2540 X_{1i} + 92,8741.10^{-1} X_{2i} - 19,5654.10^{-2} X_{1i}$

$$X_{2i} + 22,3185 \cdot 10^{-1} X_{1i} - 49,1011 \cdot 10^{-3} X_{2i}^2 \quad R^2 = 97,14$$

Observou-se que, dentre os tempos de fermentação estudados, a função estimada para a percentagem de proteína bruta apresentou valores máximos para

as concentrações de 3,0; 5,0 e 7,5 g/l de casca, correspondendo a 64,5; 35,8 e 27,2% de PB para os tempos de 88,5 (fora do intervalo estudado), 84,6 e 79,6 horas de fermentação, respectivamente (Figura 1).

Os valores de PB obtidos no presente

Quadro 1 - Teores de proteína bruta e matéria seca obtidas da casca do fruto do cacau fermentada.

Tempo (h)	C o n c e n t r a ç ã o					
	Proteína ^a (g/100 g de M.S.)			Matéria seca ^a (g/l)		
	3,0	5,0	7,5	3,0	5,0	7,5
65	31,875	21,455	16,477	2,809	4,127	7,040
70	52,055	25,035	22,122	2,450	4,271	6,092
75	54,232	29,497	24,892	2,351	3,565	4,892
80	63,790	34,245	27,127	2,100	3,337	4,047
85	63,015	33,995	28,250	1,934	2,881	4,125

^aResultados médios de quatro observações (duas repetições por nível de casca e análises em duplicata).

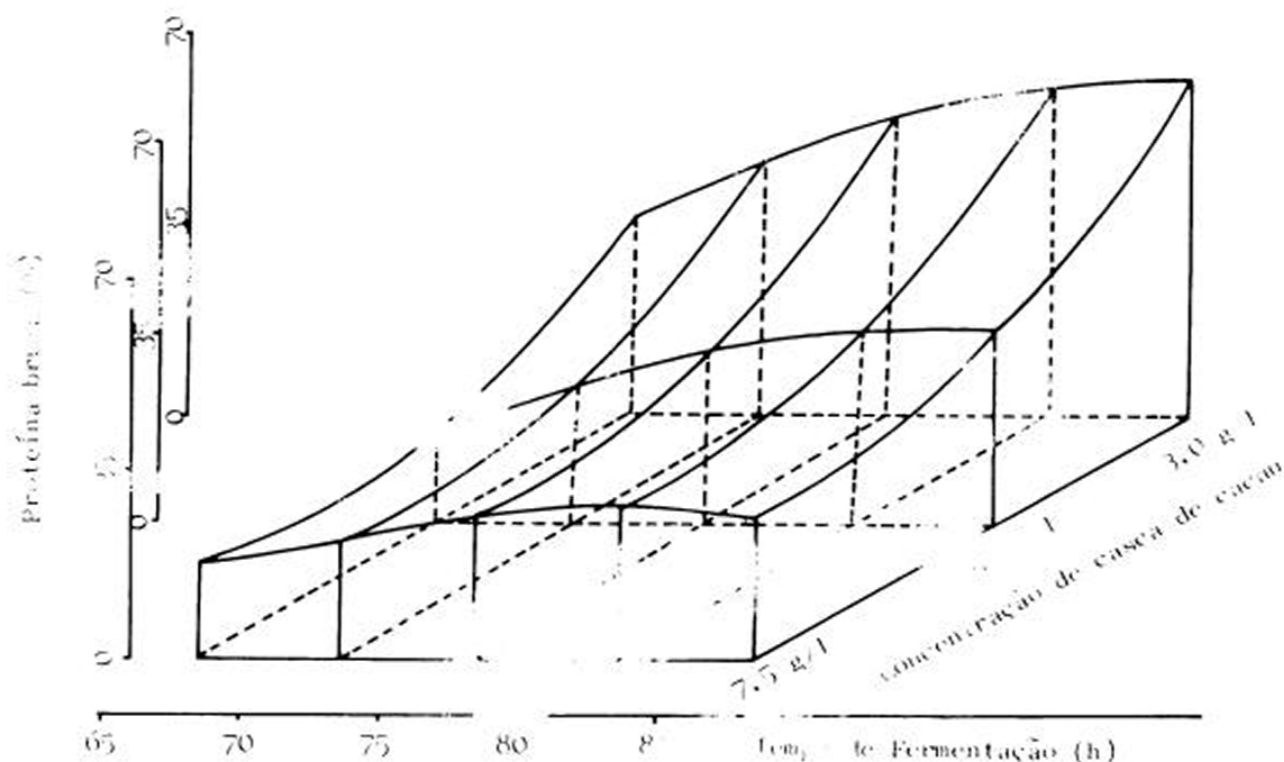


Figura 1 - Visão em perspectiva da superfície de resposta da porcentagem de proteína bruta.

experimento (Quadro 1) foram inferiores aos encontrados por Yang e Yang (1977), que trabalharam com resíduos de madeira como fonte de carbono, utilizando bactérias do gênero *Pseudomonas*. Os valores encontrados após 72 horas de fermentação na MS foram de 65,4 e 71,2% para os níveis de 1 e 4% de resíduo, respectivamente. Por outro lado, valores semelhantes a estes foram encontrados por Han, Dunlap e Callihan (1971), trabalhando com bactérias do gênero *Cellulomonas* desenvolvidas em CM-celulose. Após 48 horas, as células continham 53,9% de PB na MS.

Matéria seca. A equação ajustada para o teor de MS foi: $\hat{Y} = -2,93786 + 2,62268X_{1i} + 4,48205 \cdot 10^{-2}X_{2i} - 2,63578 \cdot 10^{-2}X_{1i}X_{2i}$ $R^2 = 97,88$

Observou-se que o teor de matéria

seca decresce com o tempo de fermentação, sendo maior na concentração de 7,5 g/l de casca dentro de um mesmo tempo de fermentação (Figura 2).

Os valores obtidos no presente experimento (Quadro 1) variaram de 7,040 a 4,125; 4,327 a 2,881 e de 2,809 a 1,934 gramas de MS por litro de meio para os intervalos de tempo de 65 a 85 horas de fermentação para os meios contendo 3,0; 5,0 e 7,5 gramas por litro de casca, respectivamente.

Han, Dunlap e Callihan (1971), estudando o crescimento de *Cellulomonas* em CMC (carboximetilcelulose), observaram que, após 2 dias de incubação, 50% do substrato havia sido convertido em material celular e o restante em produtos de metabolismo celular tais como H_2O , CO_2 e outros metabólitos extracelulares. Estas observações podem

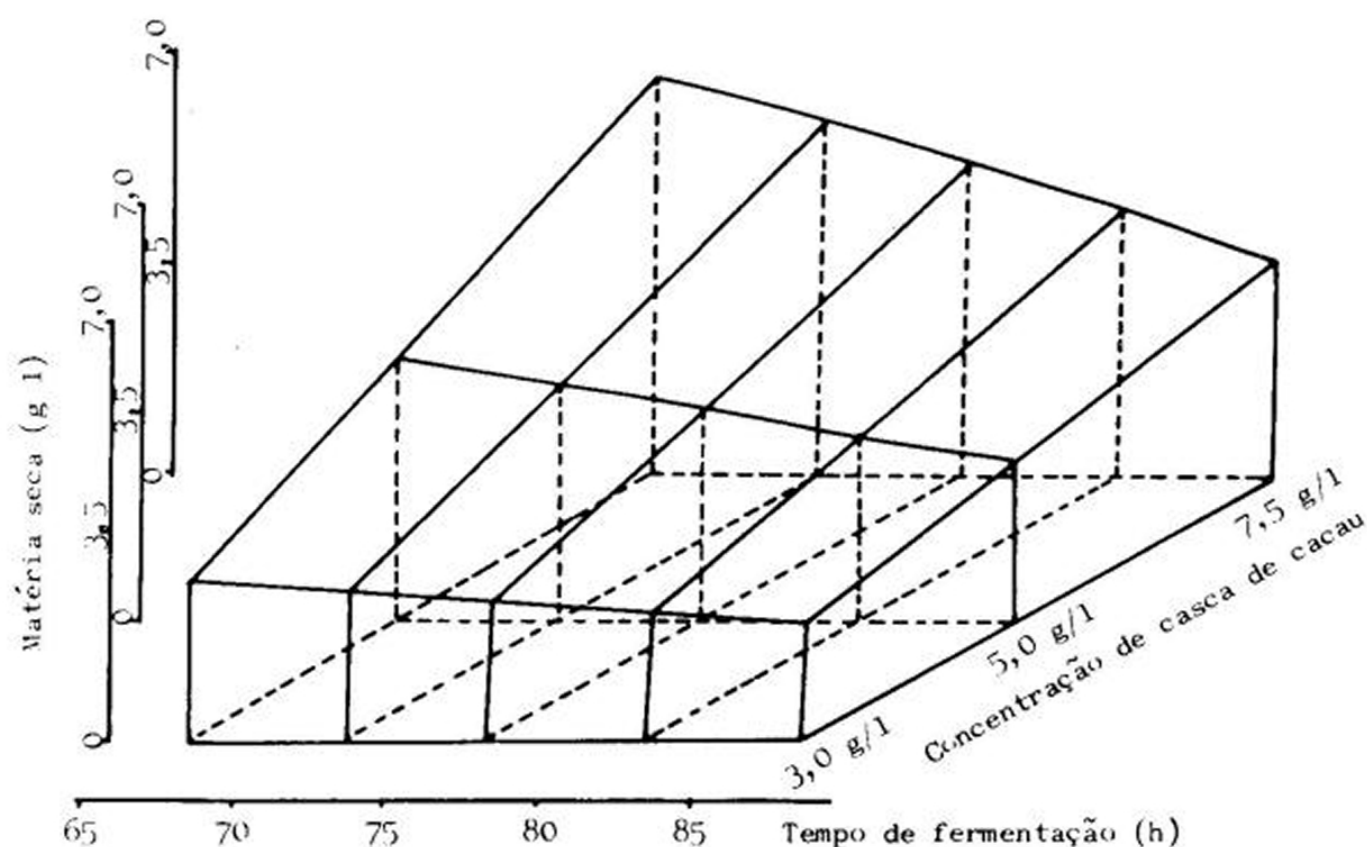


Figura 2 - Visão em perspectiva da superfície de resposta do teor de matéria seca (g/l).

justificar a queda do teor de MS com o tempo de fermentação observada no presente experimento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Menezes, Duchini e Figueiredo (1976), que, estudando a obtenção de biomassa fúngica a partir de bagaço de cana, encontraram os teores de MS de 1,886; 3,656; 7,444; 11,419 e 16,445 gramas de MS por litro de meio após 96 horas de fermentação para os níveis de 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 gramas de bagaço de cana por litro de meio respectivamente. Estudaram também a utilização de nove linhagens de fungos desenvolvendo-se em meio contendo 5,0 g/l de bagaço de cana e outros nutrientes complementares, obtendo um rendimento, em termos de MS, que variou de 2,575 a 3,175 g/l.

Conclusões

Os resultados do presente experimento mostraram que os microorganismos se comportaram diferentemente para cada concentração de casca e tempos de fermentação estudados. Em consequên-

cia, diferentes valores para PB e MS foram obtidos.

Verificou-se que, para a concentração de 3,0 g/l de casca, no tempo de 80 horas de fermentação, obtiveram-se os melhores valores para a PB. Notou-se ainda que, à medida que se diminuiu a concentração de casca e se aumentou o tempo de fermentação, melhores resultados foram obtidos para o mesmo parâmetro. Nessas circunstâncias (3,0 g de MS de casca por litro de meio em 80 horas de fermentação), o rendimento de proteína microbiana foi maior que nas outras concentrações.

Em face de tais observações, outros experimentos deverão ser conduzidos no sentido de se determinar o valor biológico da proteína, bem como determinar quantitativa e qualitativamente seus aminoácidos. Escalas maiores deverão ser testadas, facilitando, assim, o estudo da viabilidade do processo. E, por fim, novos microorganismos ou combinações dos mesmos deverão ser testados com o objetivo de se melhorar a eficiência do processo.

Literatura Citada

- ADEYANJU, S.A. et al. 1975. Cocoa husk in poultry diets. *Malaysian Agricultural Research* 4(2): 131 - 136.
- et al. 1981. Studies on the utilization of cocoa husk in livestock feeds. *In Conferencia Internacional de Investigación en Cacao*, 6^a, Caracas, 1977. Actas. Lagos, Nigéria, Cocoa Producer's Alliance. pp. 697 - 705.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. 1982. Rio de Janeiro, FIBGE, v. 43, p. 362.
- BORGES, J.M. 1971. Pode-se fazer geléia de casca de cacau. *Cacau Atualidades (Brasil)* 8(3): 11 - 13.
- BRANDÃO, A.L. de A. e TAFANI, R.R. 1976. Algumas considerações sobre os custos de transporte de casca de cacau numa fazenda tipo. *Cacau Atualidades (Brasil)* 13(4): 8 - 14.
- CAMPELO, A.M.F.L. e LUZ, E.D.M.N. 1981. Etiologia da podridão parda do cacauero nos

- Estados da Bahia e Espírito Santo, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 6:312 – 326.
- DE ALBA, J. y BASADRE, J. 1952. 'Ensayos de engorde de cerdos con raciones a base de cáscara de cacao, maíz e bananas. *Turrialba (Costa Rica)* 2(3): 106 – 109.
- _____ et al. 1954. Valor nutritivo de la cáscara de cacao para producción de leche em comparación con maíz molido y harina de yuca. *Turrialba (Costa Rica)* 4(1): 29 – 34.
- FERRÃO, J.E.M. 1957. Farinhas de cascas do cacau na alimentação de gado. *Agros (Portugal)* 40(6): 305 – 316.
- GREENWOOD-BARTON, L.H. 1965. Utilization of cocoa by-products. *Food Manufacture* 40(5): 52 – 56, 109.
- HAN, Y.W., DUNLAP, C.E. and CALLIHAN, C.D. 1971. Single-cell protein from cellulosic wastes. *Food Technology* 25(2): 32 – 35.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. sd. Normas analíticas; métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo. v. 1. pp. 14 – 63; 273 – 287.
- JARL, K. 1969. Production of microbial food from low-cost starch materials & purification of industry waste starch through the Simba Yeast Process. *Food Technology* 23(8): 1009 – 1012.
- LLAMOSAS C., A. 1976. Valor nutritivo da farinha de casca do fruto do cacau. Tese Mestrado. Viçosa, MG, Brasil, Universidade Federal. 147 p.
- _____, PEREIRA, J.M. e SOARES, M.S. 1983. A casca fresca do fruto do cacau como substituto do capim elefante no acabamento de novilhos em confinamento. *Revista Theobroma (Brasil)* 13(2): 119 – 127.
- MENEZES, J.B. de, DUCHINI, L.A. e FIGUEIREDO, I.B. 1976. Produção em laboratório de proteína fúngica em bagaço de cana. *Revista Brasileira de Tecnologia* 7(4): 439 – 446.
- ROLZ, C. y CABRERA, S.T. 1978. Producción de proteína microbiana a partir de subprodutos de indústrias agropecuárias. Guatemala, ICAITI. 171 p.
- VANANUVAT, P. 1973. Production, composition and properties of protein from *Saccharomyces fragilis*. Ph.D. Thesis. Ithaca, NY, U.S.A. Cornell University. 200 p.
- YANG, H.A. and YANG, S. 1977. Evaluation of the protein quality of single-cell protein produced from mesquite. *Journal of Food Science* 42(5):1247 – 1250.

