

# Efeito da Granulometria e da Percentagem de Bagaço de Maçã no Crescimento *Lentinula edodes* por Fermentação Submersa

## Effect of Size Particle and the Percentage Apple Pomace on Growth of *Lentinula edodes* by Submerged Fermentation

Isabela Poletto Alves Masselli

Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO

Guarapuava, PR

*isa\_masselli@hotmail.com*

**Resumo:** O cultivo do cogumelo *shiitake* [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler], tem sido amplamente estudado por diversos pesquisadores, devido as suas propriedades nutricionais e medicinais. O presente trabalho teve como principal objetivo a produção de micélio do cogumelo *shiitake* por fermentação submersa. Um planejamento composto central rotacional (PCCR)  $2^2$  com triplicata no ponto central foi utilizado para determinar a influência dos parâmetros granulometria (mm) e percentagem de bagaço de maçã sobre o crescimento do microrganismo *L. edodes*, sendo os resultados avaliados pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Em 7 dias de fermentação, os resultados demonstraram que a percentagem de bagaço de maçã foi o parâmetro de maior significância ( $p=0,011$ ), sendo que variações na granulometria não influenciaram significativamente ( $p>0,05$ ) no processo de crescimento do cogumelo. A maior produção de ergosterol (4,162 mg de Erg/g BS) foi obtida nas condições de 1,936% de bagaço de maçã e granulometria entre 0,10 e 0,25 mm. O pH final da fermentação nestas condições foi de 4,16.

**Palavras-chave:** bagaço de maçã; ergosterol; fermentação submersa; *Lentinula edodes*; *shiitake*.

Recebido em 15/08/2011 - Aceito em 26/02/2012.

RECEN Guarapuava, Paraná v. 13 n° 3 p. 399-410 Edição Especial 2011

**Abstract:** Cultivation of *shiitake* mushroom [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] has been widely studied by many researchers due to their nutritional and medicinal properties. This work had as main objective the production of *shiitake* mushroom mycelium by submerged fermentation. During the research we used a central composite design (DCCR)  $2^2$  with triplicate at the central point to determine which parameters influence the particle size (mm) and percentage of apple pomace on growth of the microorganism *Lentinus edodes*. The results were evaluated by the Response Surface Methodology (RSM), and for 7 days of fermentation, was obtained that percentage of apple pomace was the parameter of greatest significance, and variations in particle size did not influence the process of Mushroom growth in the range under study. The higher production of ergosterol (4.162 mg of Erg/g BS) was obtained under the following conditions: 1.936% of apple pomace and particle size between 0.10 and 0.25 mm. The final pH of the fermentation under these conditions was 4.16.

**Key words:** apple pomace; ergosterol; *Lentinula edodes*; *shiitake*; submerged fermentation.

## 1 Introdução

A cultura da maçã, concentrada na Região Sul, vem apresentando destaque entre as frutas de clima temperado por apresentar expansão significativa nos últimos 30 anos. Entretanto, na comercialização das maçãs, a etapa de classificação gera um descarte de 15 a 30% de frutas que não alcançaram o padrão exigido para o consumo, apresentando algum defeito de ordem física, fisiológica e/ou fitopatológica, sendo dessa forma, destinados ao setor industrial para a elaboração de sucos, vinhos, destilados e vinagres [1, 2].

Além disso, o principal subproduto do processamento da maçã, o bagaço, representa de 20 a 40% da matéria-prima em função do nível tecnológico adotado [3], e contém 11,4% de proteína, 3,7% de lipídeos, 1,8% de cinzas e 70,9% de carboidratos, fração constituída de 38,3% de açúcares neutros, 27,4% de ácido urônicos e 5,2% de amido [4], e ainda, o bagaço fresco de maçã apresenta de 10 a 15% de pectina em base seca [5, 6]. Trata-se de um material altamente instável do ponto de vista microbiológico.

gico, com elevado conteúdo de compostos fermentáveis, e seu descarte pode acarretar impacto ambiental. Entretanto, este resíduo demonstra-se excelente para fins biotecnológicos compreendendo: a produção de etanol, aromas, gás natural, ácido cítrico, pectinas, enzimas e cogumelos, além de outros processos como extração de fibras e carvão vegetal [7].

Alguns compostos presentes nos cogumelos são bioativos, tais como o ergosterol, ácido linoléico, fibras e hemiceluloses. Pesquisas têm demonstrado a ação antitumoral da molécula do ergosterol e seus derivados. Takaku e colaboradores relataram atividade antiangiogênica induzida por tumores sólidos após aplicação do ergosterol isolado do corpo de frutificação de *A. brasiliensis* [8].

Os efeitos detectados e atribuídos ao cogumelo incluem ação anticancerígena, antiangiogênica, antimutagênica e, de uma forma geral, englobam sua atividade estimulante, com ação moduladora sobre o sistema imunológico [9]. As substâncias presentes no corpo de frutificação e no micélio podem ser a chave para o entendimento do efeito sobre várias vias metabólicas, pois o cogumelo demonstra outras propriedades medicinais, como atividade antiviral, antioxidante, antibactericida, anti herpes, etc [10].

O consumo regular de cogumelos promove o bem estar por estimular a homeostasia do organismo e, em função das inúmeras potencialidades biotecnológicas, o cogumelo tem despertado o interesse da indústria farmacológica e alimentícia. Com importante valor nutricional, possui quantidade de proteínas quase equivalente a da carne e acima de alguns vegetais e frutas, ricos em vitaminas, sais minerais, ferro, cálcio, fibras, com baixo teor de gordura e carboidratos e, devido as suas características, pode ser usado em dietas de baixo teor calórico [10, 11]. As pesquisas atuais apontam o potencial do emprego de diversos cogumelos como alimento nutracêutico [12].

Diversos substratos e resíduos tem sido testados para produção submersa de micélio de várias espécies de cogumelos com *Lentinula edodes*, *Agrocybe cylindracea*, *Pleurotus ostreatus*, entretanto existe pouca informação sobre o uso de produtos derivados de maçã utilizados como substrato na produção de micélio de cogumelos [13–15].

Quanto aos valores terapêuticos e nutricionais, vários estudos realizados em insti-

tutos de pesquisa do Japão e Estados Unidos têm demonstrado o valor medicinal e terapêutico do *Shiitake*. Componentes biológicos deste cogumelo induzem a produção do interferon que potencializa o sistema imunológico do indivíduo. Possuem ação contra bactérias, vírus e fungos, além de apresentarem propriedades anti-tumorais (lentinan) e capacidade de abaixar os níveis de colesterol do sangue (eritadenina). O conteúdo elevado de proteínas e a baixa concentração de gorduras fazem do *Shiitake* uma fonte alternativa de proteínas em relação aos alimentos de origem animal. Em geral, os cogumelos apresentam duas vezes mais proteínas que os aspargos e couves, 4 vezes mais que as laranjas e 12 vezes mais que as maçãs [16].

Considerando a expansão do cultivo de *shiitake* em locais diferentes do seu *habitat* natural, o crescimento da demanda do seu consumo e sua produção tradicional em troncos de *Eucalyptus* spp., há necessidade da investigação sobre a utilização de substratos alternativos de fácil disponibilidade e a introdução de novas técnicas para o cultivo que promovam rápido crescimento micelial. Visando acelerar o processo de desenvolvimento e produtividade do mesmo, este trabalho analisou o crescimento pela produção de ergosterol.

Objetivou-se avaliar a influência da granulometria e da percentagem de bagaço de maçã na produção de ergosterol de *L. edodes* por fermentação submersa afim de otimizar a produção do fungo [17].

## 2 Material e métodos

### 2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado na pesquisa foi o *Lentinula edodes*, o qual foi isolado a partir de uma cultura comercial, adquirida no mercado Municipal de Curitiba, PR, que se encontra disponível na Micoteca do Laboratório de Cultivo de Cogumelos do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO.

### 2.2 Manutenção e repique do micro-organismo

A cepa foi mantida em tubos de ensaio contendo meio batata dextrose ágar – BDA, e repicada trimestralmente. O micélio do cogumelo foi repicado em placas de

Petri contendo BDA e incubado a 30 °C durante 15 dias.

### 2.3 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em Erlenmeyers com meio padrão contendo: glicose (20 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (3,95 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,3 g.L<sup>-1</sup>), e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,5 g.L<sup>-1</sup>); com pH ajustado a 6,0 (±0,2) em potenciômetro com NaOH 0,1 mol/L, esterilizados a 121 °C por 15 min [18]. Foram inoculados cinco pedaços (1 cm<sup>2</sup>) de ágar com micélio do cogumelo em 50 mL de meio e incubados a 30 °C a 120 r/min por 7 dias. O micélio foi separado do caldo por filtração em tela (malha de 0,5 mm<sup>2</sup>) e com auxílio de uma espátula passada através da tela com 50 mL de água destilada esterilizada. Esta suspensão de micélio foi usada na concentração de 6% (v/v) na etapa de fermentação.

### 2.4 Obtenção das maçãs

As maçãs da variedade Fuji foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI.

### 2.5 Preparo do substrato

Foram utilizados 4,0 kg de maçãs da cultivar Fuji, lavadas e sanitizadas (50 ppm de hipoclorito de sódio durante 20 min seguido de enxágue com água potável). As frutas foram cominuídas em processador de alimentos (METVISA-MPA). A massa triturada foi prensada (3,0 kgf/cm<sup>2</sup>) durante 1 min (Prensa Hidráulica Eureka, 15 cm<sup>2</sup>ton). Após a operação de prensagem o material sólido resultante, denominado de bagaço de maçã, foi lavado em água corrente e colocado para desidratação em estufa com circulação de ar (60 °C/24h, MA-035 Marconi), e acondicionado em frascos bem vedados. O bagaço de maçã já desidratado foi triturado e classificado granulometricamente em mm conforme parâmetros descritos na tabela 1.

## 2.6 Fermentação submersa do *Lentinula edodes*

A fermentação líquida foi conduzida em Erlenmeyers de 250 mL, com volume inicial de 150 mL. O pH inicial do meio foi ajustado em 6,0 e este foi esterilizado a 121 °C por 15 min. Após resfriamento, o meio foi inoculado com 6% da suspensão de micélio do inóculo e incubado a 30 °C por 7 dias sob agitação em *shaker* a 120 r/min. O meio de cultivo foi preparado com diferentes percentagens de bagaço de maçã em diferentes granulometrias conforme parâmetros descritos na tabela 1.

## 2.7 Planejamento experimental

Utilizou-se um Planejamento Composto Central Rotacional (PCCR) 2<sup>2</sup>, para avaliar a influência das variáveis com relação à produção de ergosterol por *Lentinula edodes*. Os resultados foram avaliados pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e Análise de Resíduos (ANOVA) utilizando o software Statistica 7.0. As variáveis independentes selecionadas foram a granulometria e percentagem de bagaço de maçã conforme ilustrado na tabela 1.

Tabela 1. Níveis de operação para o planejamento estatístico proposto (PCCR)

Níveis das variáveis	Variáveis	
	Granulometria (mm)	Bagaço de Maçã (%)
- $\alpha$	0,10 > G > 0,01	1,500
-1	0,25 > G > 0,10	1,936
0	1,18 > G > 1,00	3,000
+1	2,00 > G > 1,18	4,063
+ $\alpha$	2,40 > G > 2,00	4,500

$$\alpha = 1,4142$$

## 2.8 Dosagem do ergosterol

A quantificação da produção de ergosterol determina nos fungos o nível de crescimento e, portanto, de biomassa produzida [19]. O ergosterol foi extraído e dosado baseado em Carvalho [20] com algumas adaptações. Amostras de 0,25 g do micélio fermentado foram misturados com 2 mL de metanol e 0,5 mL de NaOH 2 mol/L,

bem vedados e homogeneizados por 30 s no agitador de tubos. O material foi saponificado a 80 °C/1h e após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado 0,85 mL HCl 1 mol/L e 2 mL de KHCO<sub>3</sub> 1 mol/L, sempre com agitação por 30 s após cada adição de reagente. Em seguida foram adicionados 2 mL de hexano, nova agitação por 30 s no agitador de tubos, seguido de centrifugação a 3000 r/min por 2 min e coleta da fase leve. A etapa de lavagem e extração do ergosterol com o hexano foi repetida mais duas vezes, com 2 e 1 mL. Ao hexano coletado, foi adicionado 2 g de sulfato de sódio anidro seguido de nova agitação por 15 s e repouso por 30 min. A solução foi filtrada em papel Whatmann e o hexano evaporado em estufa com circulação de ar a 30 °C, em seguida os frascos foram bem vedados e armazenados a -18 °C até quantificação da amostra [19].

A análise foi realizada após resuspensão do ergosterol em alíquota de hexano, ultrasonificação e leitura em espectrofotômetro a 281 nm que corresponde ao máximo de absorbância do ergosterol, esteroide majoritário nos fungos.

## 2.9 Determinação de pH

O pH foi determinado por meio de leitura em pHmetro digital, segundo método da AOAC [21].

## 3 Resultados e discussão

A tabela 2 mostra as concentrações de ergosterol (mg de ergosterol g<sup>-1</sup> de substrato seco) e pH final para as condições dos diferentes ensaios de fermentação do *L. edodes* por fermentação submersa, conforme o planejamento (PCCR).

A análise de variância dos resultados de produção de ergosterol em função das variáveis do planejamento (Tabela 3) indicou que somente a percentagem de bagaço de maçã (Linear) foi significativo do ponto de vista estatístico para um nível de probabilidade de 5%.

Na figura 1, observa-se que os níveis inferiores de percentagem de bagaço possibilitaram maior produção de ergosterol, entretanto a granulometria não teve influência significativa no intervalo objeto de estudo.

Tabela 2. Planejamento experimental Composto Central Rotacional (PCCR)

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Ergosterol (mg/g BS)	pH Final
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	G (mm)	B (%)		
1	-1	-1	0,25 > G > 0,10	1,936	4,162	4,16
2	-1	1	0,25 > G > 0,10	4,063	0,563	4,47
3	1	-1	2,0 > G > 1,18	1,936	2,994	4,54
4	1	1	2,0 > G > 1,18	4,063	0,697	4,56
5	-1,41	0	0,10 > G > 0,01	3	1,633	4,4
6	1,41	0	2,40 > G > 2,00	3	1,540	4,42
7	0	-1,41	1,18 > G > 1,00	1,5	2,981	4,36
8	0	1,41	1,18 > G > 1,00	4,5	1,017	4,27
9	0	0	1,18 > G > 1,00	3	1,132	4,43
10	0	0	1,18 > G > 1,00	3	1,275	4,29
11	0	0	1,18 > G > 1,00	3	1,529	4,33

Em que: G = Granulometria (mm) e B = Bagaço de Maçã (%)

Tabela 3. Análise de variância do modelo linear obtido para a produção de ergosterol por *Lentinula edodes* por fermentação submersa

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
G mm(L)	0,16981	1	0,169805	0,50541	0,503817
G mm(Q)	0,26119	1	0,261187	0,77740	0,411861
BAGAÇO % (L)	9,40373	1	9,403734	27,98954	0,001847
BAGAÇO % (Q)	1,00238	1	1,002377	2,98350	0,134861
Resíduo	2,01584	6	0,335973		
Total	12,64311	10			

O modelo matemático que descreve o comportamento linear da produção de ergosterol em função das variáveis objeto de estudo está representado pela equação (1).

$$Y = 1,312 - 0,2914X_1 + 0,4301X_1^2 - 2,1684X_2 - 0,8426X_2^2 \quad (1)$$

em que  $Y$  é a concentração de ergosterol (mg de ergosterol/g de substrato seco) e  $X_1$  e  $X_2$  são os valores codificados de G e B, respectivamente.



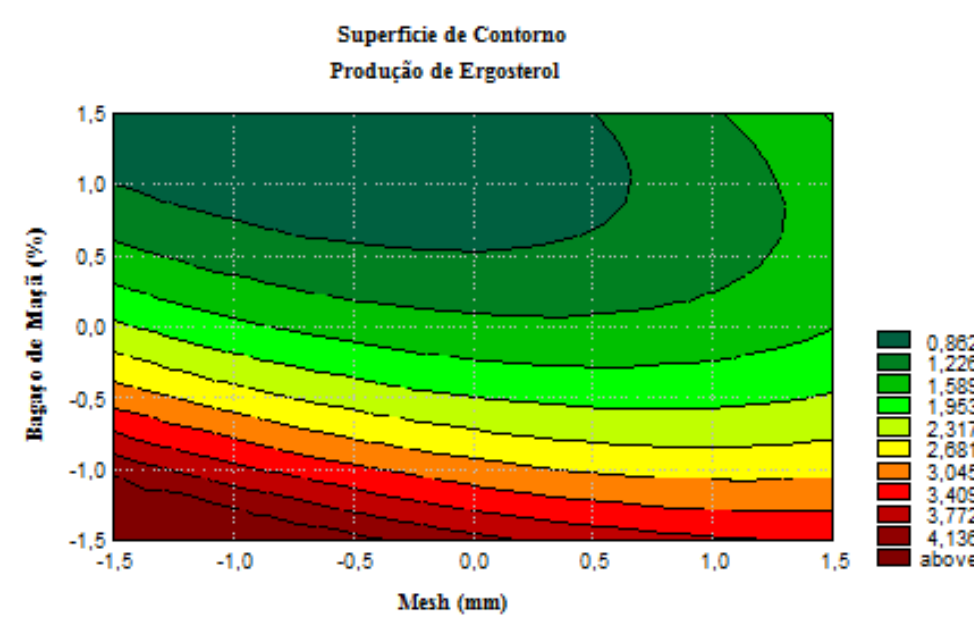


Figura 1. Superfície de Contorno que representa a Produção de Ergosterol em função das variáveis estudadas

Em relação à quantidade de bagaço utilizada, observou-se que quanto menos bagaço adicionado ao meio, maior o crescimento. Podemos concluir que isso ocorreu pelo fato de fungos serem aeróbios e, portanto, necessitam de oxigênio para crescer; ou seja, menos bagaço implica numa melhor agitação no sistema (*shaker*), fazendo com que o oxigênio fique mais disponível para os processos respiratórios destes microrganismos.

#### 4 Conclusão

No estudo realizado, observou-se que a percentagem de bagaço de maçã foi mais importante e significativa, do ponto de vista estatístico, que a granulometria do bagaço de maçã utilizado.

As melhores condições para obter uma maior produção de ergosterol (4,162 mg de Erg/g BS) e conseqüentemente crescimento do cogumelo foram para 1,936% de bagaço de maçã e granulometria entre 0,10 e 0,25 mm.

## 5 Referências

- [1] NOGUEIRA, A.; TEIXEIRA, S. H.; DEMIATE, I.; WOSIACKI, G. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. *Ciencia Tecnol Alime*, Campinas, v. 27, n. 2, p. 259–264, 2007.
- [2] KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R. H.; SIMS, L. M.; BAIN, P. J. S.; HAMILTON, B.; FENTON, G. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. In: *Modern methods of plant analyses. Analysis of plant waste materials*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, p. 75–119, 1999.
- [3] PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; WOSIACKI, G. Aproveitamento de bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. *Cienc Agrotec*, v. 29, n. 6, p. 1231–1238, 2005.
- [4] CHO, Y. J.; HWANG, J. K. Modeling the yield and intrinsic viscosity of pectin in acidic solubilization of apple pomace. *J Food Eng*, Essex, Inglaterra, v. 44, n. 2, p. 85–89, 2000.
- [5] ENDRESS, H. U. High quality resulting from product integrated environment protection-PIUS. *Fruit Processing, Schonborn*, v. 10, p. 273–276, 2000.
- [6] NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. *Seminário: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 26, n. 2, p. 179–186, 2005.
- [7] URBEN, A. F. Caracterização morfológica e fisiológica de acessos de *Agaricus blazei* e *A. sylvaticus*. In: *V Congresso Latino Americano de Micologia, Brasília*, p. 203–205, 2005.
- [8] TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J Nutr*, v. 131, n. 5, p. 1409–1413, 2001.

- [9] FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei Murrill*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *eCAM*, v. 5, n. 1, p. 3–15, 2008.
- [10] WASSER, S. P.; WEISS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *Int J Med Mushr*, v. 1, p. 31–62, 1999.
- [11] SOCCOL, C. R.; DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; VITOLA, F. M.; LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T. Mushrooms a promising source to produce nutraceutical and pharmaceutical bioproducts. In: *2<sup>nd</sup> International Congress on Bioprocesses in Food Industries, 2006*, PATRAS. *Anais 2<sup>nd</sup> International Congress on Bioprocesses in Food Industries, 2006*. v. CD.
- [12] MASUYAMA, A.; YASUI, M.; YOKOGOSHI, H.; NOMURA, M. Physiologically functional food having brain function-improving, learning ability-enhancing, and memory-enhancing functions CALPIS CO. LTD. A23C 009/12; A01N 063/00; A23L 001/31; C12N 001/00 U.S. n. 6, 284, 243. July 10, 1996; September 4, 2001.
- [13] LEE, S.; BAE, H.; KIM, N.; HWANG, S. Optimization of growth conditions of *Lentinus edodes* mycelium on corn processing waste using response surface analysis. *J Biosci Bioeng*, v. 163, n. 3, p. 161–163, 2008.
- [14] LIN, J. H.; YANG, S. S. Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei Murrill* by submerged fermentation. *J Microbiol Immunol Infect*, v. 39, p. 98–108, 2006.
- [15] KIM, H. O.; LIM, J. M.; JOO, J. H.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour Technol*, v. 96, n. 10, p. 1175–1182, 2005.
- [16] CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushroom biology – a new discipline. *Mycologist*, v. 6, p. 64–65, 1992.

- [17] GOMES-da-COSTA, S. M.; COIMBRA, L. B.; SILVA, E. S. Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 30, n. 2, p. 191–196, 2008.
- [18] FAN, L. F.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; GERMANO, S.; RAU, R.; PEDROSO, A.; SOCCOL, C. R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. Wasser, S. *et al.* LPB 03 (*Agaricomycetideae*) in submerged fermentation and its antitumor effect. *Int J Med Mushrooms*, v. 5, p. 17–23, 2003.
- [19] DALLA SANTA, H. S. Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, UFPR: Saúde Humana e Animal, 2006.
- [20] CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; OISHI, B. O.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.; SOCCOL, C. R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochem Eng J*, v. 29, p. 262–269, 2006.
- [21] A.O.A.C. Association of Official and Agricultural Chemistry. Official Methods of Analysis. 18<sup>th</sup> ed., Washington, D.C., 2005.