



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CLARICE MARIA ARAÚJO CHAGAS VERGARA

**OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS POR
PROCESSO FERMENTATIVO A PARTIR DO SUCO DE CAJU
CLARIFICADO *IN NATURA***

FORTALEZA-CEARÁ

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CLARICE MARIA ARAÚJO CHAGAS VERGARA

**OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS POR
PROCESSO FERMENTATIVO A PARTIR DO SUCO DE CAJU
CLARIFICADO *IN NATURA***

FORTALEZA-CEARÁ

2007

CLARICE MARIA ARAÚJO CHAGAS VERGARA

**OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS POR
PROCESSO FERMENTATIVO A PARTIR DO SUCO DE CAJU
CLARIFICADO *IN NATURA***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dra. Sueli Rodrigues

Co-Orientador: Prof. PhD Geraldo Arraes Maia

FORTALEZA-CEARÁ

2007

CLARICE MARIA ARAÚJO CHAGAS VERGARA

**OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS POR
PROCESSO FERMENTATIVO A PARTIR DO SUCO DE CAJU
CLARIFICADO *IN NATURA***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 27/03/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedicado ao

*Maior e mais lindo presente
que Deus me deu, meu
pequeno Dennis Filho; ao
meu amado esposo, Dennis;
e aos meus queridos e
sempre presentes pais, João
e Marfiza.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido o dom da vida, por ter me iluminado sempre e por todas as bênçãos e conquistas.

Ao meu esposo Dennis, o meu amor, respeito e admiração pela paciência, carinho, companheirismo e incentivo; e ao meu lindo Dennis Filho, que com seu sorriso, olhar meigo e gestos carinhosos me motivaram nesta caminhada.

Aos meus pais, por todo amor, dedicação e por me fornecerem meios para que eu conseguisse chegar até onde cheguei.

Ao meu irmão, Pe. João Wilkes, pelas orações e conselhos; à Guida pelo auxílio nas traduções; ao Márcio e Luciana, Joana, Aninha, Domingos e Daniel pelo apoio e paciência.

À Minha orientadora, professora Sueli Rodrigues, pela acolhida, por acreditar em meu potencial, por todos os ensinamentos, pelo apoio, pela paciência, pelos conselhos, incentivo e, principalmente, pela amizade.

À Talita Lopes Honorato, minha eterna gratidão pelo apoio na realização dos experimentos. Que Deus a ilumine nesta nova fase de sua vida.

Ao professor Geraldo Arraes Maia, pela co-orientação, ensinamentos, por ter cedido alguns equipamentos do Laboratório de Frutos Tropicais necessários à realização dos experimentos e pelo inestimável apoio ao longo deste período do mestrado.

À Prof^ª. Luciana Rocha Barros Gonçalves e a Prof^ª. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo que gentilmente aceitaram o convite de participar da banca examinadora e pelos comentários e sugestões no sentido de contribuir para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto pelo apoio na realização dos experimentos e por ter aceitado o convite para participar como suplente da banca examinadora.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, pela concessão da bolsa de estudos que muito contribuiu para a conclusão desta dissertação de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico – CNPq, pelo financiamento para execução deste projeto.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, que forneceu as amostras de suco de caju já clarificadas e por ter cedido alguns equipamentos necessários à realização dos experimentos.

À professora e exemplar Mestre Gláucia Posso Lima, minha maior conquista no período de graduação, que além dos valiosos ensinamentos se tornou uma amiga com quem eu sempre pude contar.

À professora Nágila Raquel Teixeira Damasceno, cujos ensinamentos sobre o mundo da pesquisa e amizade levarei para sempre comigo.

Aos demais colegas do Laboratório de Biotecnologia, Anita, Cristiane Rabelo, Cristiane, Alexandre, Anaísa, Rosane e Hélder pelo apoio e convivência nesta caminhada.

Ao secretário, Paulo, por toda ajuda dispensada ao longo deste período do mestrado.

As colegas de turma de mestrado que enfrentaram as mesmas dificuldades pelas quais passei e nos quais pude encontrar um ombro amigo.

A todos os professores do Mestrado que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento pessoal ou intelectual.

À Universidade Federal do Ceará na qual desenvolvi e defendi esta dissertação.

À Universidade Estadual do Ceará onde cursei a graduação e atualmente exerço o cargo de professora substituta do Curso de Graduação em Nutrição.

“Se pude ver mais longe, foi por ter-me apoiado em ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Oligossacarídeos prebióticos são carboidratos capazes de chegar ao intestino grosso onde são metabolizados pelas bifidobactérias e lactobacilos ali presentes estimulando o seu crescimento. A importância destes microrganismos está associada a sua relação com a melhoria da intolerância à lactose, melhora da função intestinal, melhoria do sistema imunológico, redução de enzimas mutagênicas e síntese de vitaminas do complexo B. A enzima dextrana-sacarase pode ser facilmente obtida a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Esta enzima catalisa a formação de dextrana em meio contendo sacarose como único substrato. Quando um acceptor está presente no meio de cultura, parte das unidades de glicose da sacarose são desviadas da síntese de dextrana formando oligossacarídeos. A utilização do suco de caju, rico em glicose e frutose, visa o aproveitamento de excedentes agrícolas, reduzindo assim o custo do processo final. Este trabalho teve por objetivo estudar a síntese de oligossacarídeos prebióticos a partir da fermentação de duas linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*; B512F e B742, ambas não patogênicas e seguras do ponto de vista alimentar. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o processo fermentativo utilizando o suco de caju como substrato apresentou bons resultados, principalmente no que se refere ao crescimento microbiano, produção da enzima dextrana-sacarase e crescimento de *Lactobacillus* sendo sua utilização, portanto viável.

Palavras-chave: *Leuconostoc mesenteroides*; oligossacarídeos prebióticos; suco de caju; processo fermentativo.

ABSTRACT

Prebiotic oligosaccharides are carbohydrates able to reach the large intestine being metabolized by *bidifidobacterium* and *lactobacillus* and stimulating their growth. The importance of these microorganisms is related with its improvement of the intolerance to the lactose, improvement of the intestinal function and the imunologic system, mutagenic enzyme reduction and vitamin synthesis of the complex B. The enzyme dextransucrase can be easily obtained through the fermentation of *Leuconostoc mesenteroides* in a medium containing sucrose as carbon source. This enzyme catalyzes the formation of dextran in a medium containing sucrose as the only substrate. When an acceptor is present in the culture medium, part of the glucose moieties from sucrose are deviated from the dextran synthesis forming prebiotic oligosaccharides. The use of the cashew juice, rich in glucose and fructose, aims to the use of an agriculture excess, reducing the cost of the final process. This work had as objective the study of synthesis of prebiotic oligosaccharides from the fermentation of *Leuconostoc mesenteroides*, B512F and B742, both non pathogenic and safe from the alimentary point of view. Based on the obtained results it can be concluded that the fermentative process using the cashew juice as substratum presented good results, mainly for the microbial growth, production of the enzyme dextransucrase and growth of *Lactobacillus* being its use, therefore viable.

Key- words: *Leuconostoc mesenteroides*, prebiotic oligosaccharides, cashew juice, fermentative process.

SUMÁRIO

	LISTA DE QUADROS E FIGURAS	xii
	LISTA DE TABELAS	xvi
1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1.	Alimentos Funcionais	22
2.2.	Oligossacarídeos	26
2.3.	Probióticos	27
2.4.	Prebióticos	28
2.4.1.	Produção e Síntese de Oligossacarídeos Prebióticos	30
2.5.	Caju	33
2.5.1.	Pedúnculo do Caju	34
2.5.2.	Composição química e físico-química do Caju	35
2.6.	Suco de Caju	37
3.	OBJETIVOS	39
3.1.	Geral	39
3.2.	Específicos	39
4.	METODOLOGIA	40
4.1.	Obtenção do suco de caju clarificado	40
4.2.	Caracterização físico química do suco de caju clarificado. ..	40
4.2.1.	pH	40
4.2.2.	Açúcares redutores	40
4.2.3.	Nitrogênio total	41
4.2.4.	Composição Mineral	42
4.3.	Obtenção dos microrganismos	42
4.4.	Ativação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512F e B742	43
4.5.	Ensaio Fermentativos	43
4.5.1.	Ensaio com <i>L. mesenteroides</i> B512F	45
4.5.2.	Ensaio com <i>L. mesenteroides</i> B742	46
4.6.	Determinação da taxa de crescimento microbiano	48
4.7.	Determinação da concentração celular	49
4.8.	Remoção de células e dextrana	49

4.9.	Determinação de açúcares e oligossacarídeos totais	49
4.10.	Determinação da dextrana	50
4.11.	Determinação da atividade enzimática	50
4.12.	Detecção de oligossacarídeos através de cromatografia de camada delgada (CCD)	50
4.13.	Estudo da aplicabilidade do produto obtido como fonte de oligossacarídeos prebióticos	51
4.14.	Análise dos dados	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1.	Caracterização do suco de caju clarificado.	54
5.2.	Ensaio Fermentativos	55
5.2.1	Varição de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sal para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F	55
5.2.2.	Varição de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> B512F	65
5.2.3.	Varição de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> B742	74
5.2.4.	Varição ,de sacarose e açúcar redutor para a linhagem <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> B742	79
5.3.	Detecção de oligossacarídeos através de cromatografia de camada delgada (CCD)	83
5.4.	Estudo da aplicabilidade do produto obtido como fonte de oligossacarídeos prebióticos	83
6	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	APÊNDICES	100

LISTA DE QUADRO E FIGURAS

QUADRO 1	Relação acceptor oligossacarídeo produzido	31
FIGURA 1	Modelo cinético para a catálise da dextrana-sacarase na presença de aceptores.	32
FIGURA 2	Exemplos do fruto do caju.	34
FIGURA 3	Dextrana produzida em função da concentração inicial de sacarose e açúcar redutor total no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F	58
FIGURA 4	Dextrana produzida em função da concentração inicial de sacarose e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F	59
FIGURA 5	Dextrana produzida em função da concentração inicial de sacarose e fosfato no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F	59
FIGURA 6	Dextrana produzida em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F.	60
FIGURA 7	Dextrana produzida em função da concentração inicial de fosfato e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F.	61
FIGURA 8	Dextrana produzida em função da concentração inicial de extrato de levedura e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F.	61
FIGURA 9	Dextrana produzida em função da concentração inicial de extrato de levedura e sal no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F	62
FIGURA 10	Dextrana produzida em função da concentração inicial de açúcar redutor e sal no meio de cultura para a linhagem L. mesenteroides B512F	62

FIGURA 11	Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de sacarose e extrato de levedura no meio para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	63
FIGURA 12	Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	64
FIGURA 13	Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de fosfato e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F . . .	64
FIGURA 14	Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de fosfato e sal no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	65
FIGURA 15	Evolução da concentração de biomassa e pH na fermentação em shaker rotatório para o teste de todas as condições do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F (a) Concentração de biomassa (mg/mL); (b) pH.	68
FIGURA 16	Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio A do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	69
FIGURA 17	Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio B do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	70
FIGURA 18	Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio C do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	70

FIGURA 19	Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio D do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	71
FIGURA 20	Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio E do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	71
FIGURA 21	Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido na fermentação controle do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	72
FIGURA 22	Evolução da biomassa e atividade enzimática (a) e taxa de crescimento microbiano (b) para fermentação com 20g/L de extrato de levedura (sem adição de fosfato) e pH controlado a 6.5 (Ensaio F) do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	73
FIGURA 23	Evolução da biomassa e atividade enzimática (a) e taxa de crescimento microbiano (b) para fermentação sem adição de extrato de levedura nem fosfato e pH controlado a 6.5 (Ensaio G) do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	73
FIGURA 24	Comparativo entre a atividade máxima enzimática (a) e a biomassa final (b) do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	74
FIGURA 25	Concentração celular em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742.	77

FIGURA 26	Açúcar redutor em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742.	78
FIGURA 27	Concentração de glicose obtida em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742.	78
FIGURA 28	Dextrana produzida em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742.	79
FIGURA 29	Concentração de frutose em função da concentração inicial de sacarose e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742	82
FIGURA 30	Concentração de sacarose não consumida em função da concentração de sacarose e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742	82
FIGURA 31	Avaliação do crescimento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> e <i>Lactobacillus johnsonii</i> em diferentes meios de cultura	84
FIGURA 32	Avaliação do crescimento de <i>Lactobacillus johnsonii</i> em diferentes meios de cultura em pH 5,0.	85
FIGURA 33	Avaliação do crescimento de <i>Lactobacillus johnsonii</i> em diferentes meios de cultura em pH 6,2.	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores médios das características químicas e físico-químicas do pedúnculo de caju de diferentes clones de cajueiro anão.	35
TABELA 2	Composição média de vitaminas no pedúnculo do caju.	36
TABELA 3	Composição média de vitaminas em diversas frutas. . .	36
TABELA 4	Caracterização química e físico química do suco de caju clarificado concentrado e diluído a 14° Brix.	38
TABELA 5	Meio padrão otimizado.	43
TABELA 6	Planejamento experimental com suco de caju clarificado com variação de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sais minerais para a linhagem B512F.	45
TABELA 7	Planejamento experimental com suco de caju clarificado com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem B512F.	46
TABELA 8	Planejamento experimental com suco de caju clarificado com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem B742.	47
TABELA 9	Planejamento experimental com suco de caju clarificado, contendo 12 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de fosfato, com variação de sacarose e açúcar redutor para a linhagem B742.	48
TABELA 10	Descrição do ensaio para avaliação da aplicabilidade do produto obtido como fonte de oligossacarídeos prebióticos.	52
TABELA 11	Descrição do ensaio para avaliação do crescimento de <i>Lactobacillus johnsonii</i> em diferentes meios de cultura.	53
TABELA 12	Composição de minerais, açúcar redutor e nitrogênio	54

	total do suco de caju clarificado	
TABELA 13	Resultados referentes ao ensaio para determinação de dextrana, oligossacarídeos, biomassa e ácido lático no suco fermentado de caju com a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	56
TABELA 14	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de dextrana no planejamento experimental com variação de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sais minerais para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F	57
TABELA 15	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de oligossacarídeos no planejamento experimental com variação de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sais minerais para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F	57
TABELA 16	Taxa máxima do crescimento específico, concentração final de biomassa, atividade máxima enzimática e tempo da atividade máxima enzimática obtida no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F.	66
TABELA 17	Análise da variância do modelo de regressão da taxa máxima do crescimento específico μ_{max} obtida no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F	66
TABELA 18	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de biomassa obtida no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F	67
TABELA 19	Análise da variância do modelo de regressão para do tempo da atividade máxima obtida no planejamento	67

	experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B512F	
TABELA 20	Concentração final de células, açúcar redutor residual, glicose residual e dextrana no suco fermentado de caju no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742	75
TABELA 21	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de células do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742	76
TABELA 22	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de açúcar redutor do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742	76
TABELA 23	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de glicose no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742	76
TABELA 24	Concentração final de dextrana, células, sacarose não consumida, glicose e frutose no suco fermentado de caju no planejamento experimental com variação de sacarose e açúcar redutor para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742.	80
TABELA 25	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de sacarose não consumida caju no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem <i>L. mesenteroides</i> B742.	81
TABELA 26	Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de frutose caju no planejamento	81

experimental com variação de extrato de levedura e
fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742.

1. INTRODUÇÃO

Recentemente o uso de alimentos funcionais, em especial aqueles contendo bifidobactérias e lactobacilos denominados probióticos, têm crescido bastante por sua relação com a melhoria da intolerância à lactose, melhoria do sistema imunológico e redução de enzimas mutagênicas tais como: beta-glucoronidase e nitroreductase, além da síntese de vitaminas do complexo B (Chung e Day, 2002), contudo estes microorganismos podem não atuar em nível intestinal por não resistir a ação de enzimas digestivas, ao baixo pH do estômago, e a bile do intestino delgado. Neste contexto, têm-se aumentado a procura por carboidratos denominados prebióticos que por não serem metabolizados no estômago e no intestino delgado, são capazes de chegar ao intestino grosso (Hidaka, 1991; Chung e Day, 2004).

Há alguns microrganismos, como o *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, que produzem glicosiltransferases, que são enzimas bacterianas produzidas durante o processo fermentativo, que agem sobre a sacarose propiciando a síntese de carboidratos. (Demuth *et al.*, 2002; Rodrigues, 2003; Segura *et al.*, 2004).

A enzima dextrana-sacarase, que faz parte do grupo das glicosiltransferases, pode ser facilmente obtida a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Esta enzima catalisa a formação de dextrana em meio contendo sacarose como único substrato. Quando um acceptor está presente no meio de cultura, parte das unidades de glicose da sacarose são desviadas da síntese de dextrana formando oligossacarídeos. O suco de caju por ser rico em glicose e frutose funciona como fonte de aceptores (frutose e glicose) para indução da produção da enzima

dextrana-sacarase, que é de expressão extracelular (Honorato *et al.*, 2005, Honorato *et al.*, 2006).

Dentre as frutas cultivadas no Nordeste Brasileiro, o caju merece destaque devido a sua importância sócio econômica para o país, em função da exploração de quase 1 milhão de hectares de cajueiros, que mobilizam no campo cerca de 280 mil pessoas e proporcionam uma produção de 217.062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pedúnculo por ano. No entanto, há uma subutilização do pedúnculo, pois o principal produto de comercialização é a castanha (Oliveira e Andrade, 2006; Sancho, 2006).

Vale ressaltar, contudo, que a utilização do pedúnculo torna-se também uma fonte de renda, principalmente quando aproveitado industrialmente para a produção de sucos, doces, cajuína, bebidas alcoólicas, sorvetes, moco-roró e outros produtos alimentícios, além de usos medicinais (Silva, 1999; Aguiar, 2001).

A utilização de substratos regionais, visa o aproveitamento de substratos agrícolas. O caju, largamente cultivado no Ceará, possui pedúnculo que é desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado à amêndoa da castanha. Considerando-se que o pseudofruto corresponde a 90% do peso do caju, calcula-se que o país produza cerca de 2 milhões de toneladas desse produto. Estima-se que o aproveitamento do pedúnculo para industrialização esteja em torno de apenas 5 %, o que significa uma perda de 95 % do total da produção anual, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento de castanha. Dentre os fatores de influência estão a alta perecibilidade do pedúnculo do caju, associada ao curto período de safra e a inexistência de métodos econômicos de preservação da matéria-prima (Leite, 1994; Costa, 1999; Sancho, 2006).

Dessa forma, o trabalho visa reduzir o custo do meio de cultura para produção de oligossacarídeos prebióticos, a partir do aproveitamento de produtos da

agroindústria tropical local, viabilizando o uso eficiente de recursos e permitindo a redução de perdas de excedentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Alimentos Funcionais

O consumo de alimentos funcionais vem aumentando bastante como resultado de uma preocupação individual com a saúde. Por outro lado, para que determinado componente do alimento tenha seu efeito comprovado são necessárias muitas etapas de avaliações e vários deles sem ação comprovada cientificamente. Pode-se dizer que essa abordagem do alimento é resultado do desenvolvimento científico e tecnológico que levou à necessidade de reconhecimento das relações entre os vários componentes dos alimentos e de seu papel na saúde do ser humano que os consome (Colli *et al.*, 2002).

As doenças crônicas que mais têm causado preocupação mundial, como câncer, obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares, estão associadas a dieta. No entanto dada a complexidade das inter-relações entre os componentes dos alimentos, traçar uma relação de causa e efeito inequívoca e definitiva é praticamente impossível (Colli *et al.*, 2002).

O conceito de alimentos funcionais surgiu a partir da hipótese de que a dieta alimentar possa controlar e modular várias funções orgânicas, contribuindo para a manutenção da saúde e reduzindo o risco do aparecimento de doenças (Borges, 2002).

Inicialmente, os alimentos funcionais foram definidos como alimentos que, além do papel nutricional, exerciam efeitos benéficos no organismo. Segundo o “Institute of Medicine of the U.S. National Academy of Sciences”, este conceito ampliou-se, abrangendo qualquer alimento ou ingrediente alimentar que possa exercer efeito benéfico no organismo (Borges, 2002).

Um conceito mais amplo para definir alimentos funcionais é o de componentes bioativos, nutrientes ou não nutrientes, contidos nos alimentos que exercem efeito benéfico para a saúde, e este efeito é dito “efeito funcional” (Roberfroid *et al.*, 1988 citados por Borges, 2002).

Os alimentos funcionais também podem ser definidos como produtos contendo em sua composição alguma substância biologicamente ativa que, ao ser incluída numa dieta usual, modula processos metabólicos ou fisiológicos, resultando em redução do risco de doenças e manutenção da saúde (Fagundes e Costa, 2003; Borges, 2002).

Vários outros autores também procuram conceituar alimentos funcionais. Para Bellisle *et al.* (1998), um alimento pode ser classificado como funcional se apresenta um nutriente ou não nutriente que atue positivamente em uma ou mais funções dentro do organismo. De acordo com Milner (1999), para que um alimento seja considerado funcional ele deve exercer efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas; fazer parte de uma alimentação usual; os efeitos positivos devem ser obtidos com quantidades não tóxicas e devem persistir mesmo após a suspensão da sua ingestão; os alimentos funcionais não são destinados a tratar ou curar doenças.

Sob um ponto de vista prático um alimento funcional pode ser um alimento natural; um alimento ao qual foi adicionado um componente, ou um alimento ao qual foi removido um componente através de processos tecnológicos ou biotecnológicos. Também poderá ser um alimento cuja natureza ou a biodisponibilidade de um ou

mais componentes foi modificada, ou qualquer combinação destas possibilidades (Diplock *et al.*, 1999; Roberfroid, 2002).

A definição legal de alimento funcional é todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (Brasil, 1999a).

A regulamentação sobre alimentos funcionais no Brasil é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que publicou em 30 de abril de 1999 três resoluções relacionadas ao tema. A resolução n° 17 aprova as diretrizes básicas para a avaliação de risco e segurança dos alimentos; a resolução n° 18 aprova as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos e a resolução n° 19 aprova procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Nas duas últimas, é feita a distinção entre alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde. A alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que uma substância (seja nutriente ou não) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. A alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças (Brasil, 1999b; Brasil, 1999c; Brasil, 1999d).

A legislação japonesa reconhece como favorecedores da saúde fibra alimentar, colinas, bactérias acidoláticas, minerais, ácidos graxos poliinsaturados, prevendo a inclusão de outros, tais como os oligossacarídeos, peptídeos e proteínas, isoprenóides e vitaminas (Colli *et al.*, 2002).

Não tendo sido estabelecida pela União Europeia qualquer legislação referente a este assunto, cada país atua isoladamente. No entanto, devido à posição competitiva das indústrias de alimentos e bebidas, reconhece-se a necessidade de um entendimento acerca das bases científicas dos alimentos funcionais (Diplock *et al.*, 1999; Pereira, Mesquita e Rayssiguier, 2007).

A *Food and Drug Administration* (FDA), em 1993, aceitou a existência de evidências suficientes que permitiam estabelecer uma correlação entre nutrientes ou alimentos da dieta e determinadas doenças. Em 1998, foram aprovadas pela FDA, correlações entre alimentos ou componentes e doenças (Pereira, Mesquita e Rayssiguier, 2007). Estas correlações foram:

- Elevado teor de cálcio e redução do risco de osteoporose.
- Baixo teor em lípideos saturados, em colesterol e lípideos totais e redução do risco de doença cardiovascular.
- Relação entre os açúcares simples e redução de cáries dentárias.
- Dietas ricas em fibras solúveis e redução do risco de doença cardiovascular.

Em 1999 a FDA anunciou que mais correlações podiam surgir através de “declarações de autorização”, emitidas por instituições com credibilidade científica, tais como: o Instituto Nacional de Saúde, o Centro de Controle de Doenças e a Academia Nacional de Ciências (Pereira, Mesquita e Rayssiguier, 2007).

A resposta do organismo frente à ingestão dos alimentos funcionais depende de fatores genéticos, fisiológicos e dietéticos, isto é, da interação dinâmica que ocorre entre os vários componentes de uma dieta (Borges, 2002).

O interesse nos alimentos funcionais resultou na comercialização de um enorme número de novos alimentos concebidos, tendo por base a prevenção de determinadas doenças, sobretudo as doenças crônicas (Hasler, 2000). Lamentavelmente, a inexistência de legislação específica referente a estes alimentos, a constante necessidade de desenvolvimento de novos produtos como estratégia de marketing e os grandes lucros associados à sua produção, constituem fortes atrações para a indústria alimentar. Conseqüentemente, são cada vez mais os novos alimentos enriquecidos ou fortificados disponíveis no mercado que se dizem benéficos para a saúde, são exemplos: os fortificados com cálcio que conferem resistência aos ossos, a farinha enriquecida com folatos que previne defeitos no tubo neural, etc. (Jacobson, 1999).

Contudo, torna-se de extrema importância o tipo de abordagem e as estratégias de marketing e publicidade a que estes alimentos estão sujeitos, pois embora o termo “alimento funcional” seja bem conhecido por todos aqueles que trabalham na área da saúde, tende a ser confundido, sobretudo pelos consumidores, que o englobam na mesma categoria do produto dietético, suplemento alimentar, produto natural, etc. (Marriott, 2000).

2.2. Oligossacarídeos

Os efeitos benéficos associados ao consumo de oligossacarídeos são, basicamente, a redução do nível de colesterol sanguíneo e a diminuição do risco de desenvolvimento de câncer, decorrente de três fatores: capacidade de retenção de substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal durante os processos digestivos; redução do tempo do trânsito intestinal, acarretando em rápida eliminação do bolo fecal, com a redução do tempo de contato do tecido intestinal com substâncias mutagênicas ou carcinogênicas e formação de substâncias protetoras pela fermentação bacteriana dos componentes da alimentação (Machado e Santiago, 2001).

Oligossacarídeos são polímeros de baixo peso molecular que contêm de 2 a 20 moléculas de açúcar. Como eles são pequenos, são prontamente hidrossolúveis e freqüentemente bastante doces (Roberfroid *et al.*, 1993).

Os oligossacarídeos não digeríveis são resistentes ao ácido do estômago e à ação da amilase e enzimas hidrolíticas intestinais. Eles entram no intestino grosso intactos e podem ser fermentados por bactérias nativas. A rafinose, encontrada no açúcar da beterraba, é um trissacarídeo feito de galactose-glicose-frutose. A estraquiose, um tetrassacarídeo composto de duas galactoses, uma glicose e uma frutose, é encontrada nos vegetais tais como leguminosas e abóbora (Ettinger, 2002; Waitzberg e Galizia, 2002). Oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 10 são extremamente importantes para várias aplicações nutricionais e farmacêuticas (Rodrigues, 2003).

2.3. Probióticos

Probióticos são alimentos contendo microorganismos vivos que, como as fibras, atuam no intestino promovendo o equilíbrio da microflora intestinal. São várias as espécies de microorganismos consideradas probióticos e as mais utilizadas são espécies de *Bifidobacterium* e de *Lactobacillus*. Essas espécies estão presentes em iogurtes, em produtos lácteos fermentados ou como suplemento alimentar (Collis *et al.*, 2002).

Estas bactérias residem naturalmente no intestino humano e de animais. A esta microbiota intestinal é atribuída a melhoria da intolerância a lactose, melhoria do sistema imunológico, redução de enzimas mutagênicas tais como: beta-glucoronidase e nitroreductase, além da síntese de vitaminas do complexo B. Estes microrganismos se destacam por metabolizar oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 10, e esta característica tem sido considerada como fator

chave para o estabelecimento de efeitos de saúde. Entretanto, para serem efetivos, os alimentos probióticos devem alcançar o intestino grosso (Chung e Day, 2002).

Entretanto as enzimas digestivas e o baixo pH do estômago, e até mesmo a bile do intestino delgado, na maioria das vezes, fazem com que a ingestão de alimentos probióticos seja inócua, uma vez que os microrganismos são inviabilizados antes mesmo de chegarem ao intestino grosso. Dessa forma, esforços para o desenvolvimento de bactérias resistentes à bile e ao pH do estomago têm sido dispensados por diversos pesquisadores (Fagundes e Costa, 2003).

2.4. Prebióticos

São considerados prebióticos os oligossacarídeos resistentes, ou seja, carboidratos complexos de configuração molecular que os tornam resistentes à ação hidrolítica da enzima salivar e intestinal, atingindo o cólon intactos, com efeitos sobre a microflora colônica uma vez que ao chegarem no intestino grosso são metabolizados pelas bifidobactérias e lactobacilos, ali presentes, estimulando o seu crescimento (Chung e Day, 2004; Fagundes e Costa, 2003; Borges, 2002).

Segundo Gibson (1999), os seguintes critérios devem ser levados em consideração ao classificar um alimento como prebiótico: não sofrer hidrólise ou absorção no intestino delgado; quando atingir o cólon, deve ser metabolizado seletivamente por número limitado de bactérias benéficas; deve ser capaz de alterar a microflora colônica para uma microflora bacteriana saudável; ser capaz de induzir efeito fisiológico que seja importante para a saúde.

Qualquer alimento que atinja o cólon pode, teoricamente, ser considerado prebiótico. No entanto, até o momento, destaque tem sido dado a inulina e os frutooligossacarídeos (FOS) que apresentam efeito bifidogênico, isto é, estimulam o

crescimento intestinal das bifidobactérias. As bifidobactérias por efeito antagonista suprimem a atividade de outras bactérias putrefativas: *Escherichia coli*, *Streptococcus faecales*, *Proteus* e outros (Borges, 2002).

A inulina é um polímero de glicose extraído da raiz da chicória ou produzida industrialmente a partir da sacarose. Apresenta um grau de polimerização (DP) de 10-12 e cadeia de 2-60 unidades de carbono (Borges, 2002).

Os FOS podem ser obtidos a partir da hidrólise da inulina pela enzima inulase e contém 5% de glicose, frutose e sacarose. Industrialmente, os FOS são produzidos a partir da sacarose por atuação da enzima frutossiltransferase, enzima fúngica obtida do *Aspergillus niger* e outros microrganismos.

Os FOS e a inulina são considerados alimentos funcionais, por desempenharem funções fisiológicas comprovadas no organismo. Alguns dos efeitos exercidos por substâncias prebióticas são: alteração do trânsito intestinal, reduzindo os metabólitos tóxicos; prevenção da diarreia ou da obstipação intestinal, por alterar a microflora colônica; diminuição do risco de câncer; diminuição dos níveis de colesterol e triglicerídeos; controle da pressão arterial; incremento da produção e biodisponibilidade de minerais; redução do risco de obesidade e diabetes insulino não-dependente e redução da intolerância à lactose (Borges, 2002).

Do ponto de vista fisiológico, a inulina e o FOS, assim como as fibras alimentares, influenciam a função intestinal com aumento da frequência evacuatória, redução do pH e aumento do peso das fezes e redução dos valores plasmáticos de triglicerídeos e colesterol (Borges, 2002). De acordo com estudo clínico realizado por Molis *et al.* (1996), 89% de FOS ingeridos atingem o cólon e 0% é excretado nas fezes. Isso porque 100% da inulina e dos FOS são fermentados no cólon. Assim, a eficiência desses prebióticos depende da população bacteriana presente no cólon que varia de indivíduo para indivíduo.

A dose mínima diária recomendada de FOS para este efeito bifidogênico pode variar de 2,75g a 4g/dia. Efeitos gastrintestinais indesejáveis foram relatados com ingestão de quantidades maiores do que 30g.

2.4.1 Produção e Síntese de Oligossacarídeos Prebióticos

Os oligossacarídeos prebióticos podem ser produzidos por três formas diferentes: extração de plantas, hidrólise ácida ou enzimática de polissacarídeos ou síntese enzimática com transglicosilases. A síntese destes oligossacarídeos pode ser realizada via processo enzimático ou fermentativo (Rodrigues, 2003).

O *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria aeróbia facultativa e, utilizando sacarose como fonte de carbono, primeiramente produz a enzima dextrana-sacarase, a qual é responsável pela conversão de sacarose. O processo fermentativo é constituído de três etapas básicas: crescimento celular, produção enzimática e produção de oligossacarídeos. O tempo total do processo é variável e o pH final atinge valores entre 4,5 e 4,8 devido à formação de metabólitos ácidos pelo microorganismo. (Rodrigues *et al.*, 2006; Rabelo *et al.*, 2006).

O crescimento celular é realizado em meio tamponado, sendo 7 o pH ótimo para esta etapa. Já o pH ótimo para a produção enzimática se encontra na faixa de 6,0 a 6,9, enquanto que o pH ótimo para a reação enzimática é de 5,2 (Rodrigues, 2003).

A enzima dextrana-sacarase é uma transglicosidase tradicionalmente utilizada para a síntese de dextrana e pode ser facilmente obtida a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Entretanto, quando além de sacarose um acceptor é também utilizado como segundo substrato, parte das unidades de glicose provenientes da quebra da sacarose promovida pela enzima, são desviadas da cadeia de dextrana, sendo

incorporadas neste segundo substrato, formando oligossacarídeos de interesse técnico (reação do acceptor). Quando maltose é utilizada como acceptor, o principal produto desta reação é a panose, que pode ser aplicada na indústria de alimentos como adoçante não cariogênico (Miyake *et al*, 1985) e agente estabilizante de bebidas (Higashimura *et al*,. 2000) . Além disso, há estudos indicando que a panose estimula o desenvolvimento de bifidobactérias e lactobacilos (Machida *et al.*, 1986), que são benéficas ao trato digestivo sem estimular o desenvolvimento de microrganismos daninhos (Higashimura *et al.*, 2000). Quando glicose ou frutose são utilizadas como aceptores há formação de gluco-olissacarídeos e leucrose, respectivamente, que assim como os malto-oligossacarídeos estimulam o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos inibindo o crescimento de microrganismos daninhos (*Salmonella* e *E.coli*).

Através do mecanismo de reação com aceptores temos a produção de oligossacarídeos conforme quadro a seguir:

Quadro 1. Relação acceptor oligossacarídeo produzido

Aceptor	Oligossacarídeo
Glicose	Isomaltose
Frutose	Leucrose
Maltose	Panose

Fonte: Alsop (1983)

Quando em meio contendo um acceptor (maltose, frutose, glicose, etc) como substrato predominante e sacarose como segundo substrato, a enzima dextrana-sacarase produz oligossacarídeos prebióticos. O ajuste da proporção acceptor/sacarose permite a supressão da síntese de dextrana e a maximização da produção de oligossacarídeos (Rodrigues, 2004a; Rodrigues *et al.*, 2006; Rabelo *et al.*, 2006). Um esquema da síntese de oligossacarídeos a partir da reação do acceptor com a enzima dextrana-sacarase pode ser visualizado na Figura 1.

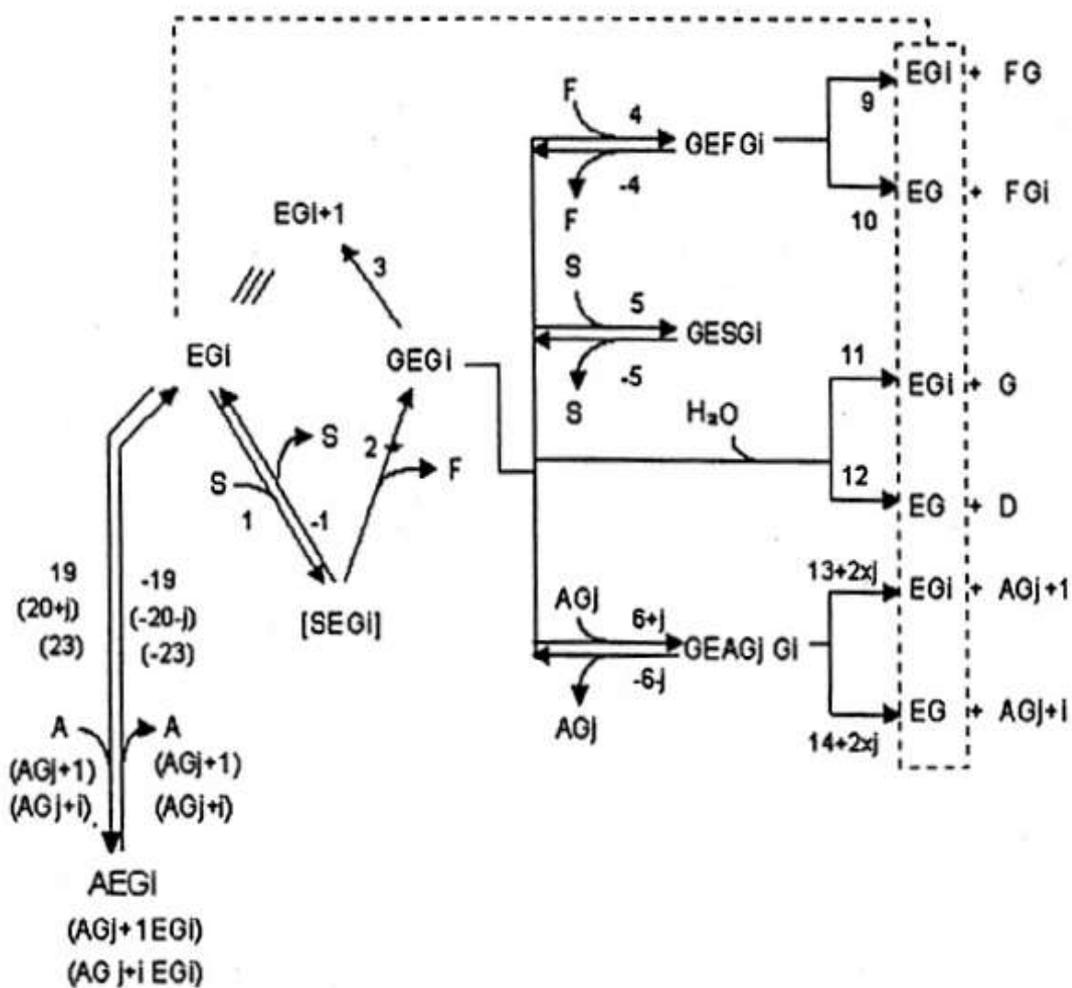
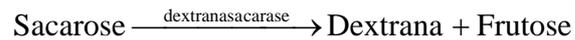


Figura 1. Modelo cinético para a catálise da dextrana-sacarase na presença de aceptores. EGI =complexo enzima cadeia crescente de dextrana; A = aceptor, G = glicose, S = sacarose, F = frutose, AG_{j+i} = produto do aceptor contendo j+i unidades de glicose (oligossacarídeo resultante da reação do aceptor). (Heincke et al., 1999)

No mecanismo aceptor da dextrana-sacarase, a sacarose é usada como substrato, onde o grupo glicosil é transferido por transglicosilação e o aceptor e a frutose são formados como produtos. A dextrana é formada em maior ou menor quantidade dependendo do aceptor e das condições de reação (Demuth, 2002), conforme reações a seguir:





2.5. Caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.) pertence à família das *Anacardiaceae*, que inclui árvores e arbustos tropicais e subtropicais. A maior diversidade de cajueiro, única espécie cultivada e a de maior dispersão do gênero, encontra-se no Nordeste brasileiro, em diversos ecossistemas, especialmente nas zonas costeiras, compondo a vegetação de praias, dunas e restingas. Além disso, é provável que o seu cultivo tenha origem no Nordeste, onde toda uma tradição de exploração pelas tribos indígenas da região é descrita pelos primeiros colonizadores (Crisóstomos *et al.*, 2001).

O fruto do cajueiro, denominado de caju, é composto pela castanha, que é o verdadeiro fruto, e o pedúnculo, que é o pseudofruto. A castanha encontra-se presa ao pedúnculo, que apresenta uma estrutura carnosa, suculenta, ligeiramente adstringente e caracterizada por agradável sabor (Soares, 1996; Filgueiras, 1999; Silva, 2006).

Mais de 98% da área ocupada com cajueiro no Brasil se encontra na Região Nordeste (Crisóstomos *et al.*, 2001). O cajueiro é considerado uma das culturas de maior importância econômica do Nordeste do Brasil, sendo cultivada principalmente nos estados do Ceará (68%), Rio Grande do Norte (11%) e Piauí (8%) (Maia *et al.*, 2001).

Em nível mundial, os principais países produtores de castanha de caju são Índia, Vietnã e Brasil, responsáveis por cerca de 70 % da produção mundial em 2003 (Oliveira e Andrade, 2004; Pertinari e Tarsitano, 2002).

A agroindústria de caju no Nordeste tem relevante importância socioeconômica em função da exploração de 677.253 hectares de cajueiros, que mobilizam no campo cerca de 280 mil pessoas e proporcionam uma produção de 217.062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pedúnculo ao ano. A matéria-prima castanha alimenta um parque industrial formado por cerca de doze fábricas de grande porte e dezenas de mini-fábricas, responsáveis pela obtenção da amêndoa de castanha de caju, destinada, na sua maioria para exportação. (Oliveira e Andrade, 2004).

2.5.1. Pedúnculo do Caju

A utilização do pedúnculo do caju é considerada como uma boa fonte de renda, além de apresentar várias opções tecnológicas de industrialização, principalmente quando aproveitado na elaboração de sucos, doces, refrigerantes, vinhos, polpas e outros produtos alimentícios e no consumo in natura, sendo bastante consumidos nos mercados interno e externo (Aguiar, 2001; Assunção & Mercadante, 2000; Borges *et al.*, 2000; Pertinari & Tarsitano, 2002; Sancho, 2006; Barros, 2007).



Figura 2. Exemplos do fruto do caju. (a) A fruta e o pseudofruto ou pedúnculo; (b) O bagaço do resultado da extração do suco de fruta (Santos *et al.*, 2007)

O Brasil é pioneiro e líder no aproveitamento de pedúnculo do caju, sendo o Estado do Ceará responsável por metade de toda a área de cajueiros nativos do Brasil – cerca de 364 mil hectares (Costa, 2003; Sancho, 2006).

2.5.2. Composição química e físico-química do Caju

O pedúnculo de caju apresenta em sua composição vitaminas, sais minerais, proteína, açúcares redutores, fibras e taninos (Souza *et al*, 2002; Sancho, 2006), possuindo cerca de 156 mg a 387 mg de vitamina C, além de minerais como cálcio, ferro e fósforo (Aguiar *et al.*, 2000 citados Sancho, 2006). O valor nutritivo do caju torna-o matéria-prima adequada para o desenvolvimento de produtos alimentícios diversos, contribuindo na melhoria da saúde e bem-estar da população. A tabela 1 mostra a composição química e físico-química média do pedúnculo do caju de três diferentes clones.

Tabela 1. Valores médios das características químicas e físico-químicas do pedúnculo de caju de diferentes clones de cajueiro anão.

Determinações	Valores médios		
	CP - 76	CP - 1001	CP - 06
Açúcares redutores (%)	8,30	8,08	8,24
Vitamina C (mg/100 mL)	158,26	157,64	153,20
Acidez Total (em % ácido cítrico)	0,49	0,47	0,47
Sólidos solúveis (°Brix)	10,76	10,04	9,74
Tanino (%)	0,27	0,31	0,30
pH	4,25	4,21	4,34
Umidade (%)	85,98	86,23	87,20
Fibra (%)	0,06	0,14	0,20
Cálcio (mg/100 g)	16,75	13,65	16,00
Ferro (mg Fe / 100 g)	0,31	0,28	0,34
Fósforo (P ₂ O ₅) (mg/100 g)	30,55	25,85	26,80
Proteína (%)	0,92	0,75	0,64

Fonte: SOUZA FILHO (1987)

O caju é considerado uma ótima fonte de vitamina C e boa fonte de vitaminas do complexo B, como riboflavina e tiamina (Tabela 2). Comparando-se com os teores encontrados em outras frutas, é possível verificar que o caju apresenta quantidades superiores de várias vitaminas, com exceção da niacina presente no abacaxi (0,7 mg/100 g), banana (0,6 mg/100 g), mamão (1,0 mg/100 g) e manga (1,2 mg/100 g) conforme mostrado na Tabela 3 (USDA, 2002; Sancho, 2006).

Granada (2004) em estudo realizado com abacaxi, encontrou resultados superiores para vitamina C, niacina e riboflavina (27,20 mg/100 g, 0,82 mg/100 g e 0,128 mg/100 g, respectivamente) e inferior apenas para tiamina (0,8 mg/100 g), sendo estes resultados inferiores aos encontrados no caju, com exceção da niacina e tiamina.

Tabela 2. Composição média de vitaminas no pedúnculo do caju

Parâmetros	Concentração
Ácido ascórbico (mg/100 g)	230,80
Tiamina (mg/100 g)	0,20
Riboflavina (mg/100 g)	0,20
Niacina (mg/100 g)	0,50

Fonte: FRANCO (1998)

Tabela 3. Composição média de vitaminas em diversas frutas

Frutas	Vitaminas (mg/100 g)			
	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Vitamina C
Abacate	0,03	0,03	0,5	2
Abacaxi	0,14	0,06	0,7	24
Banana	0,05	0,12	0,6	11
Carambola	0,03	0,02	0,04	19
Mamão	0,08	0,10	1	188
Manga	0,12	0,12	1,2	57
Melão	0,02	0,01	0,4	29

Fonte: USDA (2002)

Além de vitaminas, vale ressaltar que, o caju também apresenta em sua composição carotenóides e antocianinas, pigmentos naturais responsáveis por sua coloração característica, que também exercem funções benéficas ao organismo (Sancho, 2006).

Aguiar *et al.* (2000) citados por Sancho (2006), encontraram teores médios de carotenóides totais variando de 0,305 mg/100 g a 0,721 mg/100 g em pedúnculos de clone de cajueiro anão-precoce.

Moura (1998) encontrou teores de antocianinas da ordem de 17,58 mg/100 g em pedúnculos do clone CCP 09, 59,08 mg/100 g para o clone END 157, 17,56 mg/100 g para o clone END 183 e 76,07 mg/100 g para o clone END 189.

2.6. Suco de Caju

Segundo Sancho (2006), o segmento de sucos é considerado da maior importância na industrialização do pedúnculo de caju, com grande potencial no mercado nacional e internacional. Estudos realizados por Skliutas *et al.* (2000), relatam que o suco de caju é o segundo suco de frutas mais consumido no Brasil.

Segundo a legislação brasileira que estabelece o regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de frutas, o suco de caju com alto teor de polpa é definido como sendo a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (Brasil, 2000).

O suco de caju é uma complexa mistura de vitaminas, polifenóis, açúcar, sais minerais, ácidos orgânicos, aminoácidos, é uma excelente fonte de vitamina C e contém aproximadamente seis vezes mais vitamina C que o suco de laranja (Azoubel *et al.*, 2005).

Segundo o Instituto Brasileiro de Frutas, o mercado de sucos e néctares tem crescido a uma média de 14 % ao ano, de 1994 a 2004, sendo que em 2003 o Brasil consumiu aproximadamente 2,2 bilhões de litros de sucos, nas mais diferentes formas. Destes, 579 mil litros eram de sucos integrais, com destaque para caju (51 %) e maracujá (24 %) (Amaya-Farfan *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2006; Sancho, 2006).

O suco de caju é extraído do pseudofruto do cajueiro que é originário das regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo a cajucultura uma atividade de grande

relevância sócio-econômica para estas regiões do país (Skliutas *et al.*, 2000; Sancho, 2006).

De acordo com Cianci *et al.* (2005), o mercado interno consome em torno de 40 mil toneladas de suco de caju, o que ainda é muito pouco em relação à produção e a ampliação do mercado exportador, que depende de fatores como a melhoria tecnológica dos processos industriais, além de uma política mercadológica adequada.

O suco de caju atualmente é comercializado nas formas de suco integral, suco concentrado e clarificado. Quando o suco de caju clarificado recebe tratamento térmico recebe a denominação de cajuína (EMBRAPA, 2007). A tabela 4 apresenta a caracterização química e físico-química realizadas no suco de caju clarificado concentrado e diluído.

Tabela 4. Caracterização química e físico química do suco de caju clarificado concentrado e diluído a 14° Brix

Determinações	Teor Médio
Tanino (% de ácido tânico)	0,32
pH	4,28
Sólidos solúveis (°Brix)	14,00
Açúcares redutores (%)	12,09
Açúcares não-redutores (%)	Traços
Acidez (% de ácido cítrico)	0,35
Vitamina C (%)	0,264

Fonte: Soares *et al.* (2001)

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar o aproveitamento do suco de caju clarificado *in natura* para obtenção de oligossacarídeos prebióticos por processo fermentativo

3.2. Específicos

- Caracterização físico-química do suco de caju clarificado *in natura*
- Avaliação do processo fermentativo do suco de caju clarificado *in natura* em relação a produção de oligossacarídeos, dextrana e biomassa
- Otimização do meio de cultura utilizando suco de caju clarificado *in natura*
- Produção simultânea da enzima e dos oligossacarídeos prebióticos.
- Verificação da aplicabilidade do produto através da determinação da taxa de crescimento de *Lactobacillus johnsonii*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis* em meio formulado contendo o produto final como fonte de carbono
- Comparação em termos de eficácia dos oligossacarídeos ramificados (obtidos com a linhagem B-742) e lineares (obtidos com a linhagem B512F)
- Verificação da aplicabilidade do suco de caju fermentado como fonte de oligossacarídeos prebióticos
- Comparação da atividade prebiótica do suco de caju fermentado, suco não fermentado e meio sintético padrão otimizado

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção do suco de caju clarificado

O suco de caju foi obtido junto à Embrapa Agroindústria Tropical, que forneceu o suco já clarificado. O processo de clarificação consistiu na adição de

gelatina para decantação dos sólidos solúveis e taninos (Abreu, 2006). Neste processo, sobre 50 mL de suco de caju, resultantes da centrifugação da polpa, foram adicionados 5,0 mL de solução de gelatina 1% (p/v). Após 40 minutos, as suspensões foram filtradas em papel de filtro Whatman n° 42 (Couri *et al.*, 2002). O suco foi armazenado em freezer à temperatura de -18°C .

4.2. Caracterização físico-química do suco de caju clarificado

4.2.1. pH

O suco de caju foi inicialmente caracterizado quanto ao pH (potenciometria direta). O pH foi determinado através de leitura direta, em potenciômetro de marca Marconi®, modelo PA200, calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0 conforme a AOAC (1992).

4.2.2. Açúcares redutores

Para a determinação de açúcares redutores foi utilizado o método de Miller (1959), o qual consiste na reação da amostra com reagente de DNS. Para a determinação das concentrações de açúcares na amostra foi feita uma curva padrão de calibração através de soluções de padrão em concentrações conhecidas (faixa de 0,2 a 1,0 g/l). Esta curva de calibração é uma reta passando pela origem dos eixos, cuja equação é determinada através de regressão linear.

A determinação da curva de calibração foi feita adicionando-se 0,5 mL de cada solução padrão em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL da solução de DNS. A mistura foi aquecida à 100°C por 5 minutos e resfriada posteriormente em banho de

gelo. Após atingir a temperatura ambiente, a mistura foi diluída com água destilada (fator de diluição 10,4) e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. O reagente de DNS foi preparado dissolvendo-se 10,60 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 19,80 g de NaOH, 8,3 g de bissulfito de sódio em 1000 mL de água destilada. Após a dissolução total dos reagentes sólidos, foi adicionado à mistura 7,6 mL de fenol fundido e o volume foi completado para 1400 mL. A solução foi armazenada na geladeira em um frasco âmbar envolvido com papel alumínio para evitar decomposição de seus componentes por ação do calor e da luz. À uma alíquota de 100 mL desta solução foram adicionados 30,6 g de tartarato duplo de sódio e potássio. Após a dissolução completa do sólido o volume foi completado para 140 mL. A curva de calibração foi construída utilizando-se o reagente contendo o tartarato.

4.2.3. Nitrogênio total

A concentração de nitrogênio total foi determinada pelo método Kjeldahl (Instituto Adolfo Lutz, 1985), o qual se divide nas etapas de digestão, destilação e titulação. O procedimento realizado para digestão da amostra consistiu primeiramente em transferir 10 mL da amostra para o balão de Kjeldahl, onde adicionou-se 18 g de sulfato de potássio, 1,0 g de sulfato de cobre, 25 mL de ácido sulfúrico e algumas pérolas de vidro. Digeriu-se a 400°C/120 min, até a amostra clarificar. Para realizar a destilação, adicionou-se 150 mL de água e conectou-se ao destilador. Foi coletado cerca de 100 mL de destilado em erlenmeyer e procedeu-se a titulação com ácido clorídrico 0,1N até a solução atingir a coloração rosa.

4.2.4. Composição mineral

A composição mineral do suco de caju foi avaliada através da determinação de sódio, potássio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, zinco e manganês. Para a quantificação de minerais as análises foram conduzidas em triplicata, sendo as amostras inicialmente submetidas ao processo de digestão por 24 horas com mistura ácida nitro-perclórica na proporção de 3:1 (600 mL de HNO₃ 65% p.a e 200 mL de HClO₄ 72%). A leitura para quantificação de sódio e potássio foi através de fotometria de emissão de chamas e para os demais minerais através de espectrofotometria por absorção atômica (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997).

4.3. Obtenção dos microrganismos

As linhagens do microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL B-512F e NRRL B-742), o *Lactobacillus johnsonii* (NRRL B-2178) e a *Escherichia coli* (NRRL B-14573) foram obtidos junto ao banco de microrganismos do Departamento Estadual de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agricultural, Peoria, Illinois, NRRL Culture Collection*). A *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) foi obtida junto ao Laboratório de Microbiologia Geral do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Todas as linhagens foram obtidas na forma liofilizada.

4.4. Ativação do *Leuconostoc mesenteroides* B512 F e B742

As linhagens de *L. mesenteroides* foram ativadas a partir de meio sintético (indutor da produção da enzima) contendo somente sacarose como fonte de carbono (indutor da produção da enzima). A composição do meio sintético, considerado como controle nos ensaios fermentativos, é apresentada na Tabela 5. O microrganismo foi ativado por 12 horas em incubador (*shaker*) rotatório (30 °C e 150 rpm). O pH do meio sintético inicial foi ajustado para pH 6,5 com ácido fosfórico.

Tabela 5. Meio padrão otimizado

Reagente	Concentração (g/L)
Sacarose	50,0
Extrato de levedura	20,0
Fosfato de potássio dibásico	20,0
Sulfato de magnésio	0,20
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,01
Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01
Água	1L

Fonte: Guimarães *et al.* (1999)

4.5. Ensaio Fermentativos

Para a realização deste trabalho, estudou-se a síntese de oligossacarídeos prebióticos a partir da fermentação de duas linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*; B512F e B742, ambas não patogênicas e seguras do ponto de vista alimentar. A principal diferença entre as linhagens utilizadas é a linearidade da cadeia do oligossacarídeo formado na reação do acceptor. A linhagem B512F forma oligossacarídeos de cadeia linear, enquanto que a linhagem B742 forma oligossacarídeos de cadeia ramificada. Os uso de duas linhagens visa comparar a eficácia do oligossacarídeo obtido em relação a estrutura de sua cadeia (linear ou ramificada).

Os ensaios para o estudo da produção da enzima e, conseqüentemente, de dextrana e de oligossacarídeos a partir da fermentação com as duas linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, utilizando como substrato o suco de caju clarificado *in natura*, foram realizados em *shaker* rotatório a 30 °C e 150 rpm. Este substrato foi adicionado de sacarose para induzir a produção da enzima, possibilitando a síntese de dextrana e dos oligossacarídeos.

Após ativação das linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* em meio sintético, conforme descrito no item 4.4, 15 mL da cultura foram inoculadas em um Erlenmeyer contendo 150 mL do meio de cultura com suco de caju e pH ajustado para 6,5 (valor ótimo de crescimento do *L. mesenteroides*).

O término da fermentação foi considerado quando o pH atingiu o valor aproximado de 4,5, no qual a enzima em meio sintético é rapidamente desnaturada a temperatura do ensaio (Rodrigues et al., 2003), exceto para o primeiro planejamento experimental para o *L. mesenteroides* B512F que foi conduzido por 24 horas.

Foram monitorados durante o processo fermentativo o pH, a atividade enzimática e a concentração celular através da retirada de amostras em intervalos regulares de tempo.

4.5.1. Ensaio com *L. mesenteroides* B512F

A produção dos oligossacarídeos foi estudada através de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} com um ponto central (Barros Neto et al., 2001) onde foram variadas as concentrações iniciais de sacarose e açúcar redutores totais (através da diluição da matéria-prima) e sendo considerados ensaios com ou sem a correção do meio de cultura no tocante à adição de íons metálicos e de suplementação da fonte de nitrogênio e fósforo, conforme apresentado na Tabela 6. As faixas de concentração analisadas foram escolhidas em função da existência de estudos prévios referidos na literatura para a linhagem B512F e resultados já obtidos

no laboratório de Biotecnologia/DETAL/UFC (Rabelo *et al.*, 2006; Honorato *et al.*, 2006). O pH inicial dos ensaios foi ajustado para 6,5 (valor ótimo de crescimento do *L.mesenteroides*). Os sais minerais variados no planejamento experimental se referem ao percentual da solução salina com base no meio sintético.

Tabela 6. Planejamento experimental com suco de caju clarificado com variação de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sais minerais para a linhagem B512F. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Sacarose (g/L)	Açúcar Redutor (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Fosfato (g/L)	Sais minerais (%)
1	50.0	50.0	20.0	20.0	100
2	50.0	50.0	0.0	20.0	0
3	50.0	25.0	20.0	0.0	100
4	50.0	25.0	0.0	0.0	0
5	25.0	50.0	20.0	0.0	0
6	25.0	50.0	0.0	0.0	100
7	25.0	25.0	20.0	20.0	0
8	25.0	25.0	0.0	20.0	100
9	37.5	37.5	10.0	10.0	50

Foram avaliadas no segundo ensaio cinco diferentes combinações de concentrações variando de 0 g/L a 20 g/L, de extrato de levedura e fosfato (K_2HPO_4) em meio de cultura adicionado de 50 g/L de açúcares redutores totais (suco de caju clarificado contendo glicose e frutose) e 50 g/L de açúcar não redutor (sacarose), na produção da enzima dextrana-sacarase conforme planejamento experimental 2² com dois pontos centrais apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Planejamento experimental com suco de caju clarificado, contendo 50 g/L de açúcar redutor e 50 g/L de sacarose, com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem B512F. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Extrato de Levedura (g/L)	Fosfato (g/L)
--------	---------------------------	---------------

A	20	20
B	20	0
C	0	20
D	0	0
E	10	10

Ao término do experimento, dois ensaios complementares foram realizados sem adição de fosfato com pH controlado a 6,5, sendo um deles com adição de extrato de levedura (Ensaio F) e outro sem adição de extrato de levedura (Ensaio G)

4.5.2. Ensaios com *L. mesenteroides* B742

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental central compósito 2^2 com dois pontos centrais para a linhagem B742 com o intuito de avaliar as concentrações ótimas de extrato de levedura e fosfato. Para tanto foram verificadas dez diferentes combinações de concentrações variando de 4 g/L a 20 g/L, de extrato de levedura e fosfato (K_2HPO_4) em meio contendo 50 g/L de açúcares redutores totais (suco de caju clarificado contendo glicose e frutose) e 50 g/L de açúcar não redutor (sacarose), conforme apresentado na tabela 8. A faixa de concentração analisada foi escolhida em função da existência de estudos prévios e resultados já obtidos no laboratório de Biotecnologia/DETAL/UFC (Rabelo *et al.*, 2006; Honorato *et al.*, 2006).

Tabela 8. Planejamento experimental com suco de caju clarificado, contendo 50 g/L de açúcar redutor e 50 g/L de sacarose, com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem B742. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Extrato de Levedura (g/L)	Fosfato (g/L)
1	4	4
2	4	20
3	20	4
4	20	20
5	4	12

6	20	12
7	12	4
8	12	20
9	12	12
10	12	12

Visando identificar as concentrações ótimas de sacarose e açúcar redutor para a linhagem *L. mesenteroides* B742 foi realizado um segundo planejamento experimental compósito central 2² com dois pontos centrais com concentrações de sacarose e açúcar redutor variando de 25 g/L a 50 g/L, considerando que nestas concentrações foram constatados melhores resultados em ensaios prévios realizados no Laboratório de Biotecnologia/DETAL/UFC, conforme apresentado na tabela 9. As concentrações de extrato de levedura e fosfato foram de 12 g/L e 20 g/L conforme determinado pelo planejamento anterior.

Tabela 9. Planejamento experimental com suco de caju clarificado, contendo 12 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de fosfato, com variação de sacarose e açúcar redutor para a linhagem B742. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Sacarose (g/L)	Açúcar Redutor (g/L)
1	25	25
2	25	50
3	50	25
4	50	50
5	25	37,5
6	50	37,5
7	37,5	25
8	37,5	50
9	37,5	37,5
10	37,5	37,5

4.6. Determinação da taxa de crescimento microbiano

Os parâmetros cinéticos, taxa de crescimento microbiano, foram calculados usando as equações 1 e 2. A taxa máxima de crescimento específico (μ_{\max}) foi determinada graficamente e confirmada usando a equação 3 na fase de crescimento exponencial.

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

$$\ln X = \mu_{\max} t \quad (3)$$

r_x	taxa de crescimento volumétrico (mg/mL.h)
X	concentração de biomassa (mg/mL)
μ_{\max}	crescimento específico máximo (h^{-1})
t	tempo (h)

4.7. Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi realizada através de leitura da absorbância a 590 nm em espectrofotômetro Spectrum® SP2000UV. O procedimento consistiu em diluir uma alíquota da suspensão contendo as células em H₂O destilada e realização da leitura da absorbância contra um branco com o meio de cultura na mesma diluição. A massa seca foi calculada através de uma curva de calibração.

4.8. Remoção de células e dextrana

As células foram removidas por centrifugação em centrífuga da marca Sigma® modelo G-15 por 10 minutos a 10000 rpm. A dextrana foi removida através da precipitação com 3 volumes de etanol 96 % (Rodrigues *et al.*, 2004b).

4.9. Determinação de açúcares e oligossacarídeos totais

As concentrações de glicose, frutose e sacarose, bem como de oligossacarídeos totais foram determinadas por HPLC. Para isso foi utilizado um Cromatógrafo Líquido Varian ProStar equipado com bomba modelo ProStar 221, detector de índice de refração Prostar modelo 335 RI e forno para termostatização MetaTherm™. Os carboidratos foram separados em uma coluna Biorad 87HPX à temperatura de 85 °C. A fase móvel era constituída de água deionizada com fluxo de 0,3 mL/min. A temperatura do detector foi de 45 °C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10. Determinação da dextrana

A dextrana precipitada, conforme descrito no item 4.9, foi re-suspensa em água destilada e determinada segundo o método fenol-sulfúrico para determinação de carboidratos totais (Dubois *et al.*, 1956).

4.11. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da enzima dextrana-sacarase foi determinada através da quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS (Miller, 1959). Os ensaios foram realizados em condições ótimas de síntese (pH 5,2, 30°C). A atividade enzimática foi determinada em termos de unidade de dextrana-sacarase

(UDS/10 μ L) a 30°C e pH 5,2, condições nas quais a enzima é estável e apresenta atividade máxima (Mibieli, 2001). A UDS nada mais é que a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana a 30 °C liberando 0,52 mg de frutose em 1 hora. A atividade enzimática, determinada *in vitro* para o caldo bruto livre de células, foi calculada através de regressão linear. Como substrato foi utilizada uma solução contendo 10 % de sacarose em tampão acetato de sódio 20 mM (pH 5,2) contendo 0.05 g/L de CaCl₂.

4.12. Detecção de oligossacarídeos através de cromatografia de camada delgada (CCD)

Os oligossacarídeos foram detectados através de cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel da marca Whatman, sendo utilizadas placas K6 (sílica gel 60 A). Foi utilizada a técnica de múltiplas ascensões, que permite uma melhor separação dos produtos de interesse, e placas de dimensões de 20 x 20 cm permitindo a corrida de aproximadamente 15 amostras simultâneas (Robyt, 2000). Para a separação dos oligossacarídeos, produtos do aceptor, foi utilizado o sistema acetonitrila/ acetato de etila/1-propanol/água (85:20:50:90), sendo realizadas duas ascensões.

Como sistema de detecção, foi utilizada uma solução constituída de 0,3% (p/v) de 1-naftiletlenodiamina e 5 % de H₂SO₄ em metanol. Ao término da última ascensão, as placas eram removidas da câmara de desenvolvimento, secas com secador de cabelos no interior de uma capela para remoção completa da fase móvel e, em seguida, mergulhadas rapidamente no reagente de detecção. Após secagem natural em capela (à temperatura ambiente e sem uso do secador de cabelos), as placas eram colocadas em um forno a 120°C por 10 minutos para revelação das manchas.

4.13. Estudo da aplicabilidade do produto obtido como fonte de oligossacarídeos prebióticos

O estudo para verificar a aplicabilidade do produto obtido como fonte de oligossacarídeos prebióticos foi realizado através da determinação do crescimento do *Lactobacillus johnsonii* em meio MRS (Meio de Man, Rogosa e Sharpe) e *E. Coli* e *Samonella choleraesuis* em meio TSB (Caldo Trypticase de Soja), cuja composição está descrita nos Apêndices I e II, contendo como fonte de carbono os oligossacarídeos do preparado bruto.

O ensaio foi conduzido de forma a analisar a diferença da atividade prebiótica entre o suco de caju fermentado, não fermentado e meio sintético padrão; entre as duas linhagens de *L. mesenteroides* e em função de alterações na composição dos meios sintéticos MRS e TSB, conforme tabela 10. Os resultados do ensaio foram comparados com o crescimento, avaliado através da determinação da densidade ótica a 590 nm.

Tabela 10. Descrição do ensaio para avaliação da aplicabilidade do produto obtido como fonte de oligossacarídeos prebióticos. Fortaleza, 2006.

Código	Descrição
C	Suco de caju clarificado <i>in natura</i> não fermentado
C1	Suco de caju clarificado <i>in natura</i> fermentado com <i>L. mesenteroides</i> B512F
C2	Suco de caju clarificado <i>in natura</i> fermentado com <i>L. mesenteroides</i> B742
Sac.	Meio sintético MRS adicionado de sacarose em substituição a glicose (20 g/L) ou meio TSB com adição de sacarose em substituição a dextrose (2,5 g/L)
Glic.	Meio sintético MRS adicionado de glicose (20 g/L), mantendo o tipo de açúcar padrão, ou meio TSB com adição de glicose em substituição a dextrose (2,5 g/L)
Frut.	Meio sintético MRS adicionado de frutose em substituição a glicose (20 g/L) ou meio TSB com adição de frutose em substituição a dextrose (2,5 g/L)
Dxt.	Meio sintético MRS adicionado de dextrana em substituição a glicose (20 g/L) ou meio TSB com adição de dextrana em substituição a dextrose (2,5 g/L)

	g/L)
Inoculo	Meio sintético padrão para <i>L. mesenteroides</i>

Vale salientar que os meios de cultura usando o suco de caju foram inicialmente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e o pH foi ajustado para o mesmo pH do meio sintético, sendo 6,2 para MRS e 7,3 para TSB. Antes da leitura da densidade ótica foi efetuada a diluição em água destilada na proporção de 1:10. As leituras foram realizadas após um período de 48 horas de incubação em estufa tipo BOD a 37 °C.

Com o intuito de avaliar melhor o comportamento do *Lactobacillus johnsonii* em diferentes meios de culturas foi realizado um outro ensaio onde avaliou-se os itens descritos na tabela 11. Este ensaio foi realizado em duas condições de pH (5,0 e 6,2). As concentrações de glicose e frutose adicionadas aos meios sintéticos foram baseadas nos açúcares residuais do suco de caju fermentado.

Tabela 11. Descrição do ensaio para avaliação do crescimento de *Lactobacillus johnsonii* em diferentes meio de cultura. Fortaleza, 2006.

Código	Descrição
1	Suco de caju clarificado <i>in natura</i> sem extrato de levedura
2	Suco de caju clarificado <i>in natura</i> com extrato de levedura
3	Suco de caju clarificado <i>in natura</i> fermentado com <i>L. mesenteroides</i> B512F
4	Suco de caju clarificado <i>in natura</i> fermentado com <i>L. mesenteroides</i> B742
5	Meio sintético fermentado com <i>L. mesenteroides</i> B512F
6	Meio sintético fermentado com <i>L. mesenteroides</i> B742
7	Meio MRS com adição de 4 g/L de glicose e 3 g/L de frutose
8	Meio MRS com adição de 3 g/L de glicose e 4 g/L de frutose
9	Meio MRS com adição de 10 g/L de glicose e 9 g/L de frutose
10	Meio MRS com adição de 9 g/L de glicose e 17 g/L de frutose

4.14. Análise dos Dados

Os ensaios fermentativos foram realizados em duplicata e as determinações analíticas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Statistica (Statsoft) versão 5.0. Os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do suco de caju clarificado

Na tabela 12 são apresentados os resultados referentes a determinação da composição em minerais, açúcar redutor e nitrogênio total do suco de caju clarificado. Os resultados evidenciaram que o suco de caju apresenta em sua composição diversos minerais, sendo uma fonte significativa de potássio, zinco, ferro e manganês. Pode-se constatar ainda que o suco de caju apresenta açúcares redutores e proteína. Segundo Honorato *et al.*, 2006, o suco de caju clarificado é rico em glicose e frutose e, dessa forma, funciona como fonte de aceptores (frutose e glicose). Como não apresenta sacarose, recomenda-se que este carboidrato seja adicionado para indução da produção da enzima dextrana-sacarase, que é de expressão extracelular.

Tabela 12. Composição de minerais, açúcar redutor e nitrogênio total do suco de caju clarificado. Fortaleza, 2006.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Componente	Conteúdo (g/L)	Componente	Conteúdo (g/L)
Fósforo	1.21 ± 0.01	Cobre	< DL*
Potásio	13.13 ± 0.87	Ferro	6.97 ± 2.68 x 10 ⁻³
Cálcio	< DL*	Zinco	11.20 ± 4.31
Magnésio	1.17 ± 0.07	Manganês	6.40 ± 0.35
Sódio	0.09 ± 0.0		
Enxofre	0.81 ± 0.02		
Açúcar Redutor	90.45 ± 5.25		
Nitrogênio total	2.58 ± 0.58		

* DL – Limite de Detecção

5.2. Ensaio Fermentativos

5.2.1. Variação de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sal para a linhagem *L. mesenteroides* B512F

O planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) com o *L. mesenteroides* B512F (Tabela 6) foi realizado para avaliar a produção de dextrana, oligossacarídeos, biomassa e ácido láctico (pH), conforme tabela 13. A análise do suco fermentado demonstrou que houve crescimento celular e produção da enzima, uma vez que houve produção de dextrana e de oligossacarídeos. O ensaio onde constatou-se maior produção de dextrana e de oligossacarídeos foi o ensaio 1 com 50 g/L de açúcar redutor, 50 g/L de sacarose, 20 g/L de fosfato, 20 g/L de extrato de levedura e com a adição de sais minerais. De acordo com os resultados da Tabela 13, de forma geral, alguns valores de pH final são levemente inferiores aos observados para a fermentação em meio sintético padrão onde o valor mínimo observado é de

4,0 (Rodrigues, 2003). A relação oligossacarídeos *versus* dextrana produzidos evidencia que há maior proporção de produção de oligossacarídeos em todos os ensaios, sendo a relação maior para os ensaios 8 e 9.

Tabela 13. Resultados referentes ao ensaio para determinação de dextrana, oligossacarídeos, biomassa e ácido láctico no suco fermentado de caju clarificado com a linhagem *L. mesenteroides* B512F. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Dextrana (g/L)	Oligossacarídeos (g/L)	Biomassa (ABS 660nm)	Relação Oligos./ Dext.	pH
1	4.37 ± 0.04	9.30 ± 0.60	2.58 ± 0.04	2,13	4.02
2	2.76 ± 0.09	4.60 ± 0.43	2.15 ± 0.02	1,67	4.11
3	2.72 ± 0.10	6.07 ± 0.43	2.06 ± 0.01	2,23	3.79
4	1.51 ± 0.07	1.80 ± 0.60	1.52 ± 0.04	1,19	3.73
5	2.65 ± 0.06	6.64 ± 0.69	1.94 ± 0.01	2,51	3.89
6	1.49 ± 0.18	3.68 ± 0.33	1.66 ± 0.04	2,47	3.72
7	2.99 ± 0.18	7.41 ± 0.33	2.66 ± 0.04	2,48	4.20
8	1.56 ± 0.06	5.20 ± 0.69	2.47 ± 0.01	3,33	4.00
9	2.39 ± 0.09	7.18 ± 1.31	2.29 ± 0.15	3,00	3.83

Segundo a análise de variância (ANOVA), os modelos de regressão são significantes ao nível de 95% de confiança, o que ocorre quando o valor de F obtido for superior ao listado (Rodrigues *et al.*, 2006). Os resultados apresentados nas tabelas 14 a 16 evidenciam que foram obtidos bons coeficientes de correlação para as concentrações finais de dextrana, oligossacarídeos e biomassa (densidade ótica). A adição de sais minerais não apresentou efeito significativo para as respostas analisadas, em virtude do suco de caju já apresentar em sua composição sais minerais e, desta forma, a adição destes não se faz necessária.

Tabela 14. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de dextrana no planejamento experimental com variação de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sais minerais para a linhagem *L. mesenteroides* B512F. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	6,7008	5	1,34	57,24
Erro	0,0702	3	0,02	
Total	6,7710	8		
Coeficiente de correlação (R^2)	0,9896			
Valor listado de F (95%)				$F_{5,6} = 9,01$

Tabela 15. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de oligossacarídeos no planejamento experimental com variação de sacarose, açúcar redutor, extrato de levedura, fosfato e sais minerais para a linhagem *L. mesenteroides* B512F. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	37,3669	5	7,47	9,18
Erro	2,4411	3	0,81	
Total	39,8080	8		
Coeficiente de correlação	0,9387			
Valor listado de F (95%)				$F_{5,6} = 9,01$

As superfícies de respostas obtidas com os ensaios realizados nas condições da tabela 6 e resultados reportados na tabela 13 são apresentados nas figuras 1 a 12.

De acordo com os resultados apresentados na figura 3, observa-se que a concentração final de dextrana obtida no meio de fermentação aumenta com a elevação tanto da concentração de sacarose como de açúcar redutor. Já os resultados apresentados na figura 4 mostram que o aumento da concentração de sacarose e extrato de levedura adicionados ao meio de cultura promovem também o aumento da concentração final de dextrana, sendo que o efeito do extrato é superior ao da sacarose.

Os resultados apresentados na figura 5 evidenciam que a concentração final de dextrana obtida no meio de fermentação aumenta com a elevação tanto da concentração de sacarose quanto de fosfato. Por sua vez, nos resultados apresentados na figura 6 pode-se constatar que fosfato e o extrato de levedura estão diretamente relacionadas com concentração final de dextrana, sendo os efeitos das duas variáveis bastante significativos.

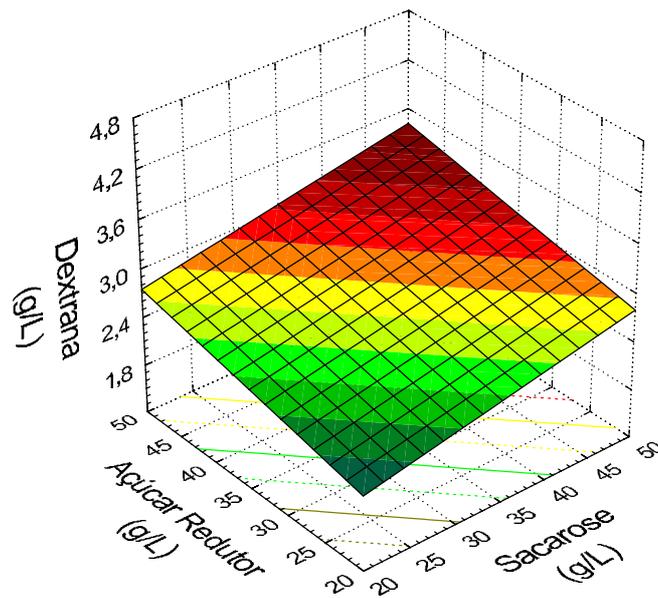


Figura 3. Dextrana produzida em função da concentração inicial de sacarose e açúcar redutor total no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F

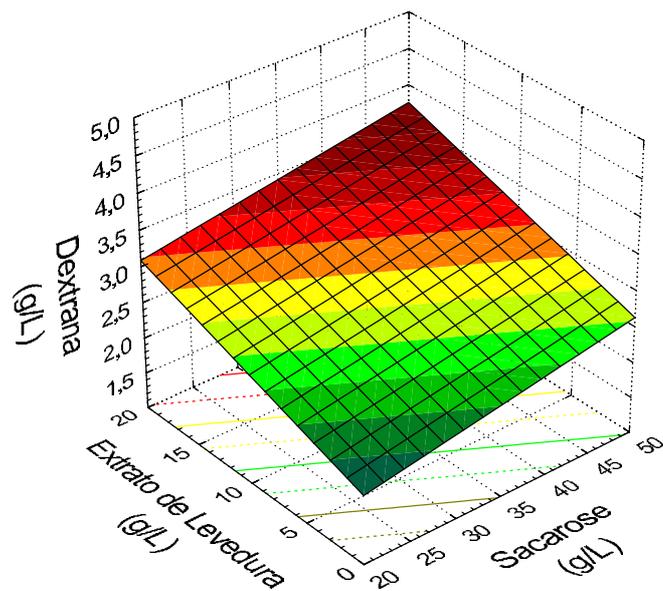


Figura 4. Dextrana produzida em função da concentração inicial de sacarose e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

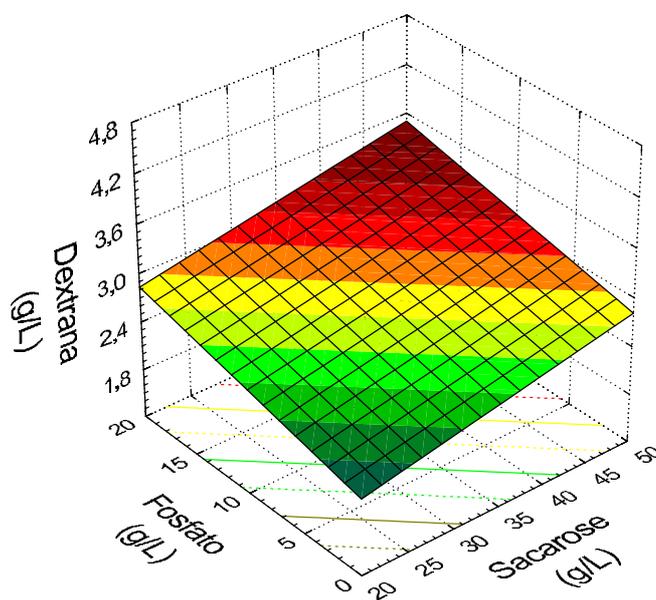


Figura 5. Dextrana produzida em função da concentração inicial de sacarose e fosfato no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

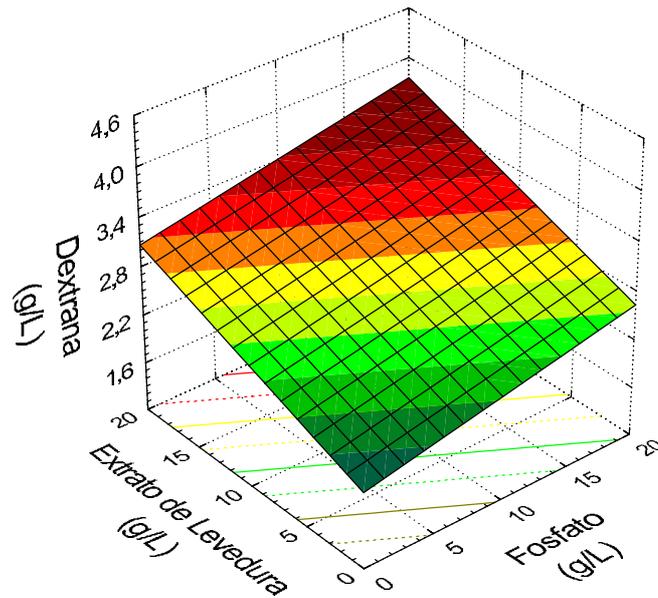


Figura 6. Dextrana produzida em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

De acordo com os resultados apresentados na figura 7, observa-se que a concentração final de dextrana obtida no meio de fermentação aumenta discretamente com a elevação da concentração de açúcar redutor. A figura 8 mostra que tanto o aumento da concentração de açúcar redutor quanto o de extrato de levedura adicionados ao meio de cultura promovem também o aumento da concentração final de dextrana, sendo que o efeito do extrato é superior ao do açúcar redutor.

Com base nos resultados apresentados na figura 9, que mostram o efeito do sal e do extrato de levedura na concentração final de dextrana pode-se constatar que o efeito do extrato de levedura é consideravelmente maior que o do sal. Através dos resultados apresentados na figura 10 pode-se constatar que o açúcar redutor e o sal exercem influência em relação à concentração final de dextrana todavia os efeitos não são tão significativos.

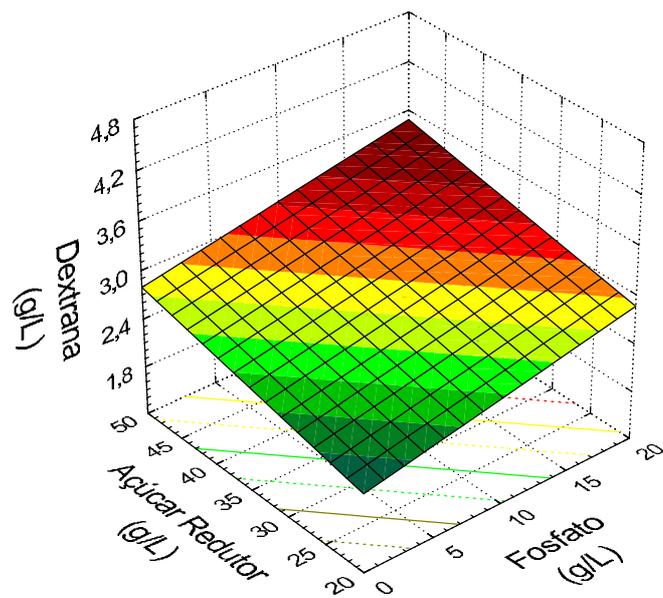


Figura 7. Dextrana produzida em função da concentração inicial de fosfato e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

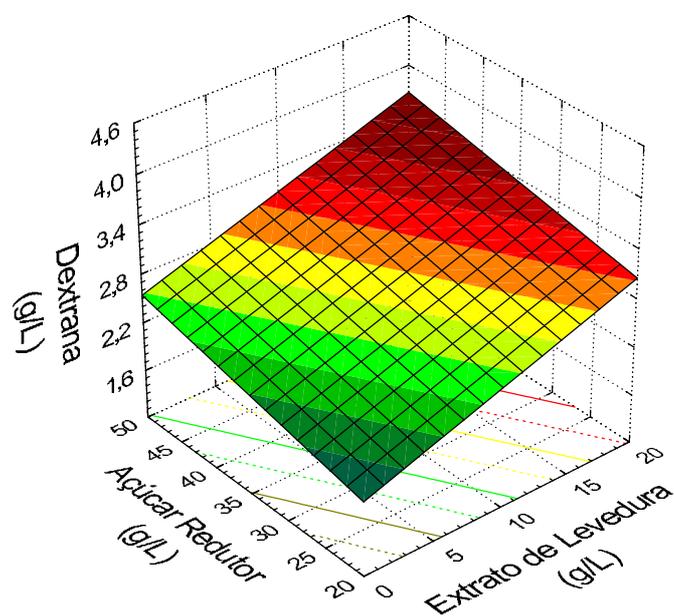


Figura 8. Dextrana produzida em função da concentração inicial de extrato de levedura e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

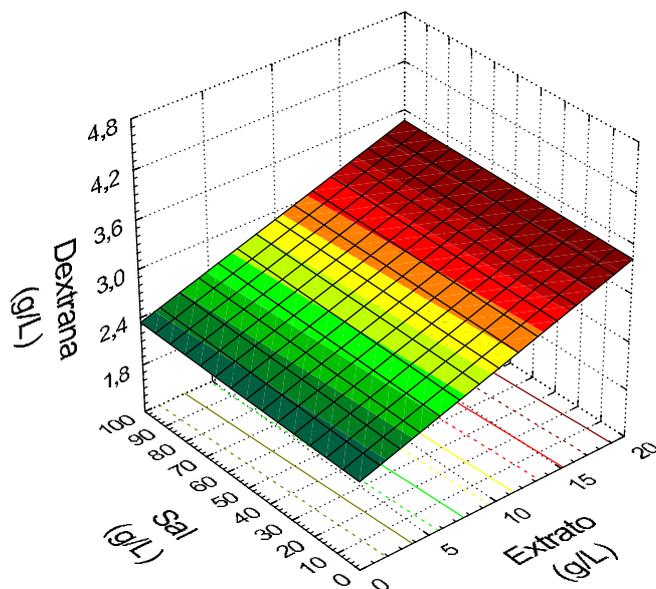


Figura 9 Dextrana produzida em função da concentração inicial de extrato de levedura e sal no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

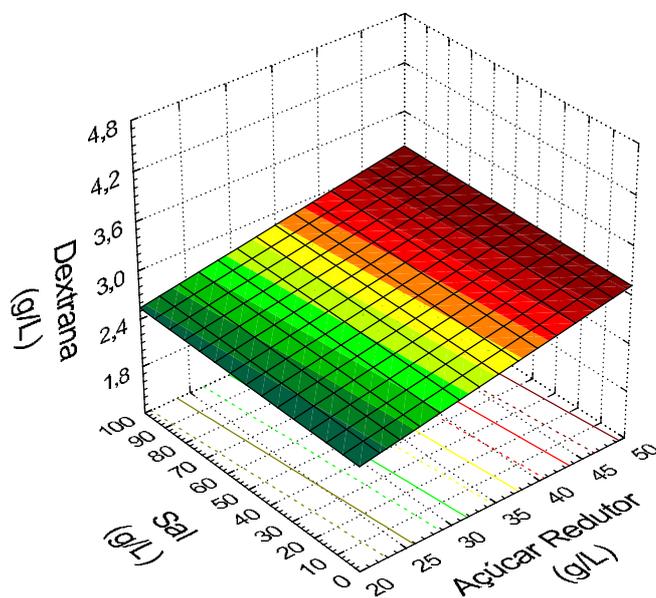


Figura 10. Dextrana produzida em função da concentração inicial de açúcar redutor e sal no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* 512F.

Diante dos resultados apresentados na figura 11, observa-se que a concentração final de oligossacarídeos obtidos no meio de fermentação aumenta

com a elevação da concentração de sacarose e do extrato de levedura. A figura 10 mostra que tanto o aumento da concentração de fosfato quanto o de extrato de levedura adicionados ao meio de cultura promovem também o aumento considerável da concentração final de oligossacarídeos.

Com base nos resultados apresentados na figura 13, pode-se constatar que tanto a elevação do fosfato quanto de açúcar redutor contribui para elevar a concentração final de oligossacarídeos. Através dos resultados apresentados na figura 14 pode-se constatar que o fosfato exerce influência em relação a concentração final de oligossacarídeos todavia o efeito do sal não é tão significativo.

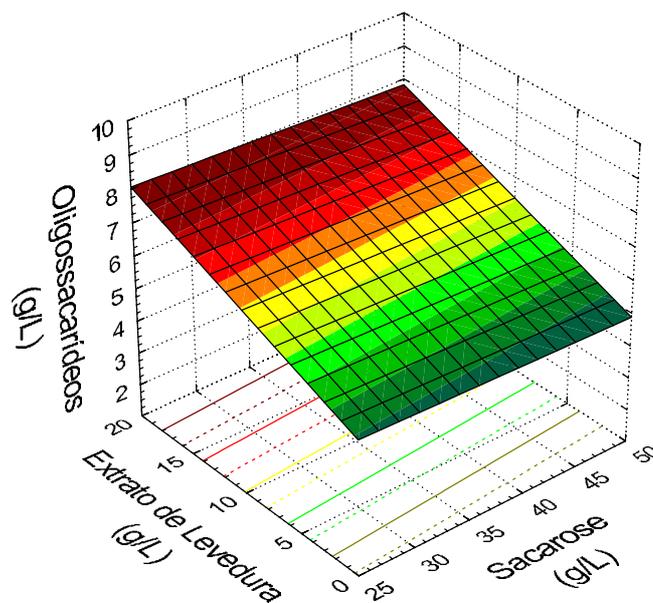


Figura 11. Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de sacarose e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

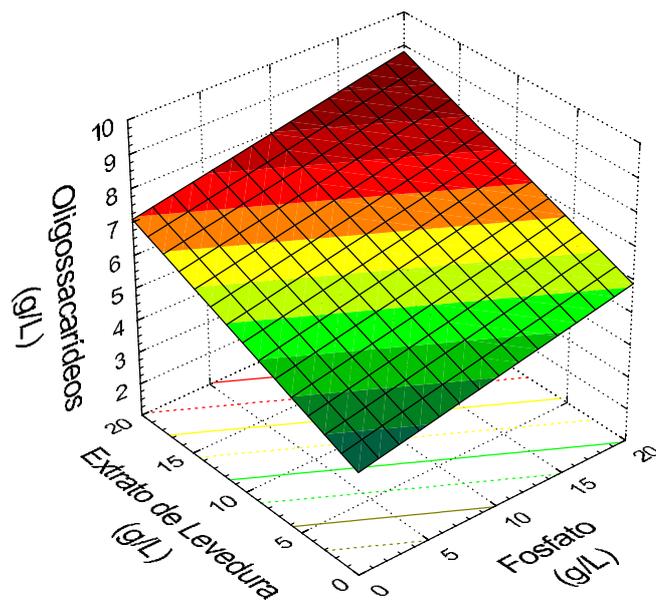


Figura 12. Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de fósforo e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

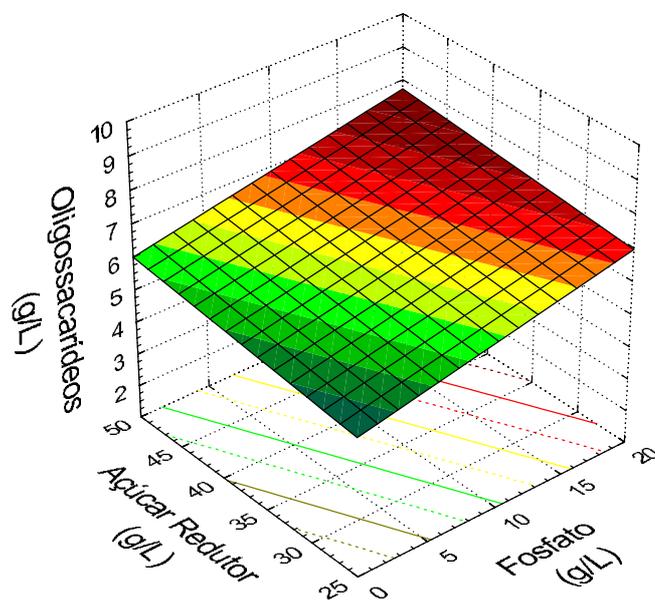


Figura 13. Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de fósforo e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

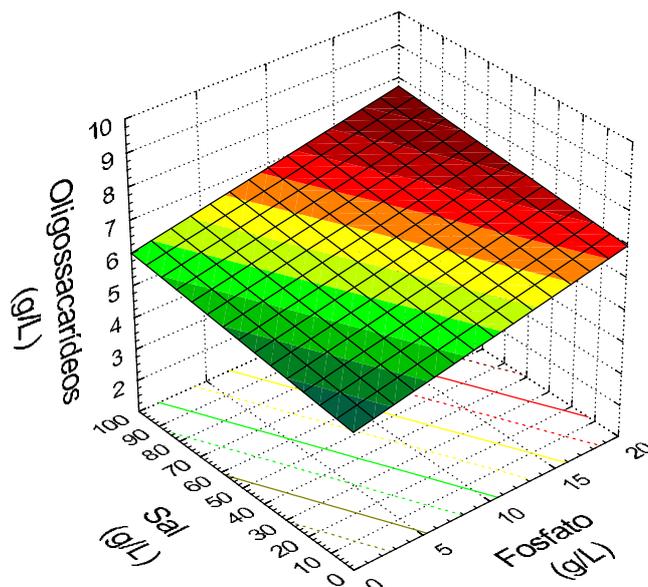


Figura 14. Oligossacarídeos produzidos em função da concentração inicial de fosfato e sal no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

Devido ao forte efeito da adição de extrato de levedura e de fosfato, observados no primeiro planejamento experimental, foi realizado um planejamento experimental para verificar a influência destes componentes na produção da enzima dextrana-sacarase, responsável pela síntese de dextrana e oligossacarídeos (Tabela 7).

5.2.2. Variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F

A tabela 16 apresenta os resultados obtidos com o planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato no suco de caju clarificado fermentado com linhagem *L. mesenteroides* B512F (Tabela 7) referentes a taxa máxima do crescimento específico (μ_{\max}), concentração final de biomassa, atividade máxima enzimática (E_{\max}) e tempo da atividade máxima enzimática ($t_{E_{\max}}$).

Tabela 16. Taxa máxima do crescimento específico (μ_{\max}), concentração final de biomassa, atividade máxima enzimática (E_{\max}) e tempo da atividade máxima enzimática ($t_{E_{\max}}$) obtida no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Extrato de Levedura (g/L)	Fosfato (g/L)	μ_{\max} (h^{-1})	Biomassa (mg/mL)	E_{\max} (UDS/ 10 μ)	$t_{E_{\max}}$ (h)
A	20	20	0.25	1.59 \pm 0.06	7.0	7.0
B	20	0	0.22	1.13 \pm 0.03	3.0	3.0
C	0	20	0.19	1.00 \pm 0.04	5.0	7.0
D	0	0	0.09	0.65 \pm 0.02	3.0	3.0
E	10	10	0.22	1.13 \pm 0.04	5.0	5.0
Controle	20	20	0.40	2.44 \pm 0.08	6.0	6.0

De acordo com as tabelas de ANOVA com as análises de variância do modelo de regressão ao nível de 95% de significância, apresentadas nas tabelas 17 a 19, o valor de F obtido foi superior ao listado para a taxa máxima do crescimento específico μ_{\max} , concentração de biomassa e para o pico do tempo da atividade máxima.

Tabela 17. Análise da variância do modelo de regressão da taxa máxima do crescimento específico μ_{\max} obtida no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	0.02895	3	0.00965	34.26
Erro	0.00169	6	0.00028	
Total	0.03064	9		
Coeficiente de correlação	0.9448			
Valor listado de F (95%)				$F_{3,6} = 4.76$

Tabela 18. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de biomassa obtida no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	0.8840	3	0.294	34.13
Erro	0.0518	6	0.0086	
Total	0.9358	9		
Coeficiente de correlação	0.9446			
Valor listado de F (95%)				$F_{3,6} = 4.76$

Tabela 19. Análise da variância do modelo de regressão para do tempo da atividade máxima obtida no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	25.5	3	8.5	500
Erro	0.10	6	0.017	
Total	25.60	9		
Coeficiente de correlação	0.9961			
Valor listado de F (95%)				$F_{3,6} = 4.76$

A figura 15 apresenta um comparativo para o crescimento celular (biomassa), pH e atividade enzimática durante os ensaios fermentativos. De acordo com a figura 15, houve um crescimento microbiano similar para os ensaios A, B e E e controle até 3 horas de fermentação. Os ensaios sem adição de extrato de levedura (C e D) apresentaram menor crescimento quando comparado com os que receberam adição de 20 g/L de extrato de levedura. Após 3 horas de fermentação o meio sintético (controle) apresentou um crescimento bem maior comparado ao meio de suco de caju fermentado. O ácido láctico foi produzido durante o crescimento microbiano o que pode ser evidenciado pela queda do pH em função do tempo, conforme resultados apresentados na figura 15b. Os ensaios B e D apresentaram uma queda mais acentuada de pH devido a ausência de fosfato nestes meios, o qual exerce efeito tamponante sobre o meio (Rodrigues, 2003). Efeito similar ocorreu com

o ensaio E onde foi adicionado apenas 10 g/L de fosfato. Os ensaios controle, A e C apresentaram queda menos acentuada do pH.

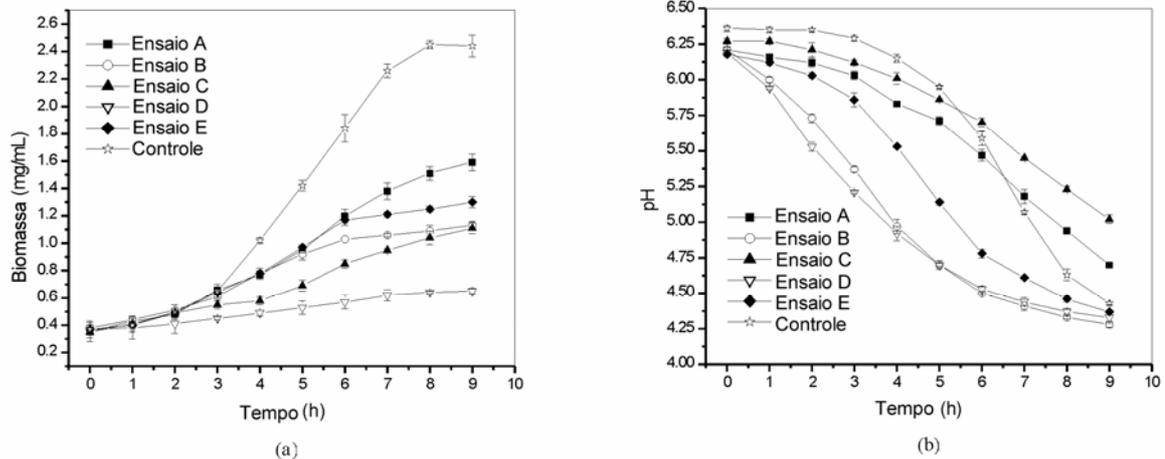


Figura 15. Evolução da concentração de biomassa e pH na fermentação em *shaker* rotatório para o teste de todas as condições do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F (a) Concentração de biomassa (mg/mL); (b) pH.

As figuras 16 a 21 apresentam a produção de enzima, concentração celular (biomassa) pH e taxas cinéticas obtidas nos ensaios fermentativos. As taxas cinéticas foram calculadas com a média do valor da concentração de biomassa. A biomassa e a atividade enzimática aumentam ao decorrer no tempo e ocorre a redução de pH. Um pico da atividade enzimática foi observado nos ensaios B, D e E. A enzima se desnatura rapidamente a pH aproximado de 4,5 conforme estudos prévios utilizando o meio sintético (Rodrigues *et al.*, 2003). No ensaio A, a atividade enzimática teve uma queda mais acentuada após 7 horas de fermentação, pois a enzima sofreu desnaturação pelo pH. No ensaio C o pH permaneceu em torno de 5,0 até o final da fermentação. O ensaio D apresentou o menor crescimento microbiano e a menor concentração final de biomassa quando comparado com os demais ensaios.

Os resultados com o meio sintético (controle) são apresentados na figura 21. O pico de atividade (0.50 ± 0.02 UDS/ $10 \mu\text{L}$) foi encontrado em 6 horas de fermentação a um pH de 5.57 (Figura 19) e o crescimento microbiano inferior foi observado até 3 horas de fermentação. Após este período o pH teve uma queda acelerada ocasionando a desnaturação da enzima. A taxa máxima do crescimento específico apresentada nas figuras 16 a 21 foi calculada usando a equação 3 descrita anteriormente no item 4.6.

Em geral, os meios formulados com o suco de caju clarificado apresentaram taxas de crescimento menores quando comparadas com o meio sintético padrão otimizado. Por outro lado, o meio sintético apresentou valores inferiores de atividade enzimática.

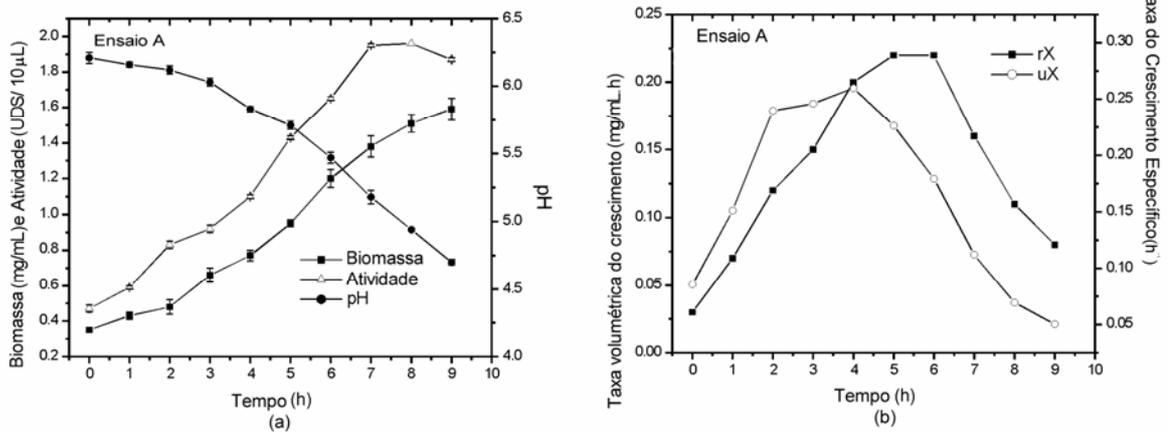


Figura 16. Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio A do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

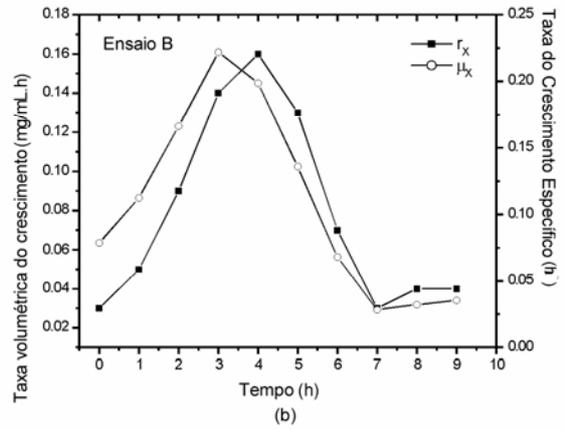
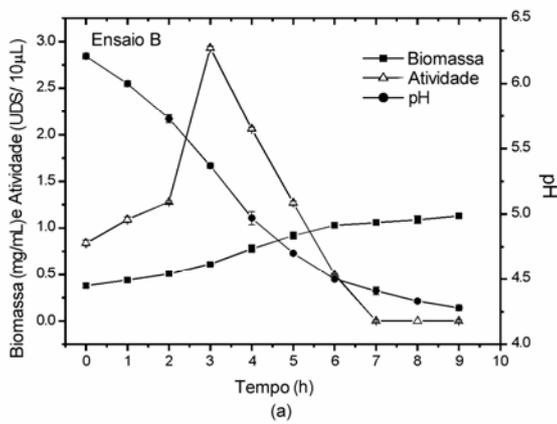


Figura 17. Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio B do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

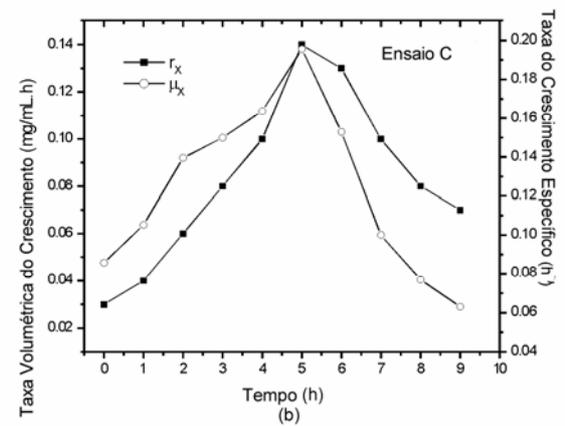
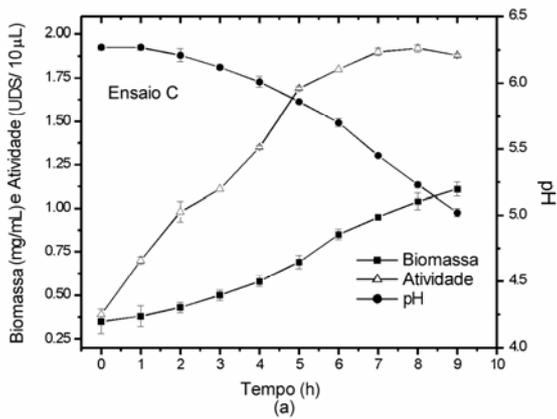


Figura 18. Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio C do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

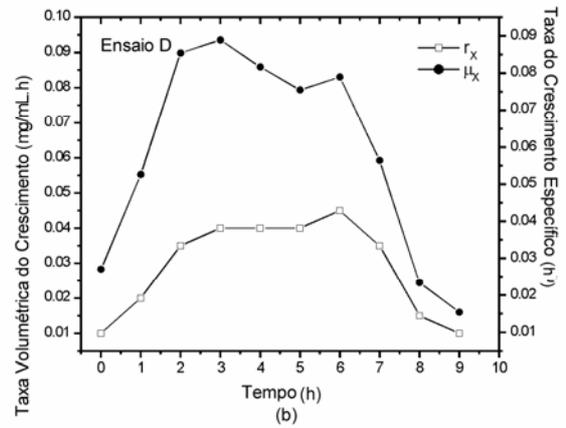
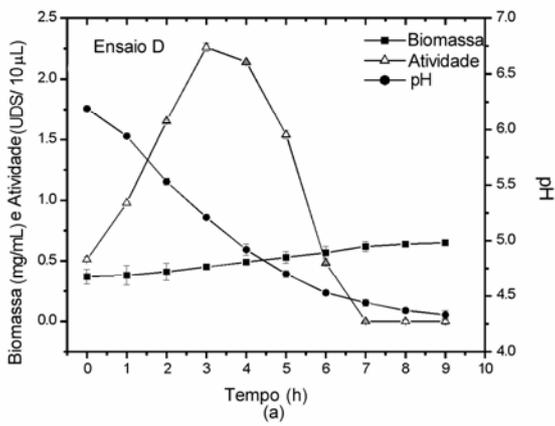


Figura 19. Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio D do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

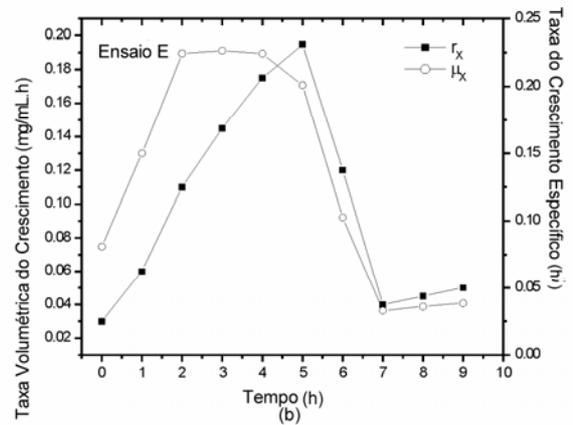
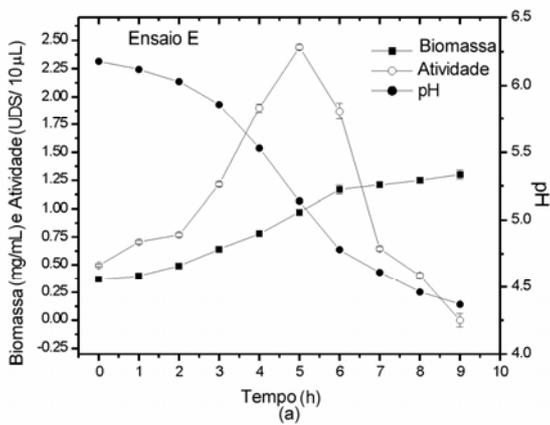


Figura 20. Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido no Ensaio E do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

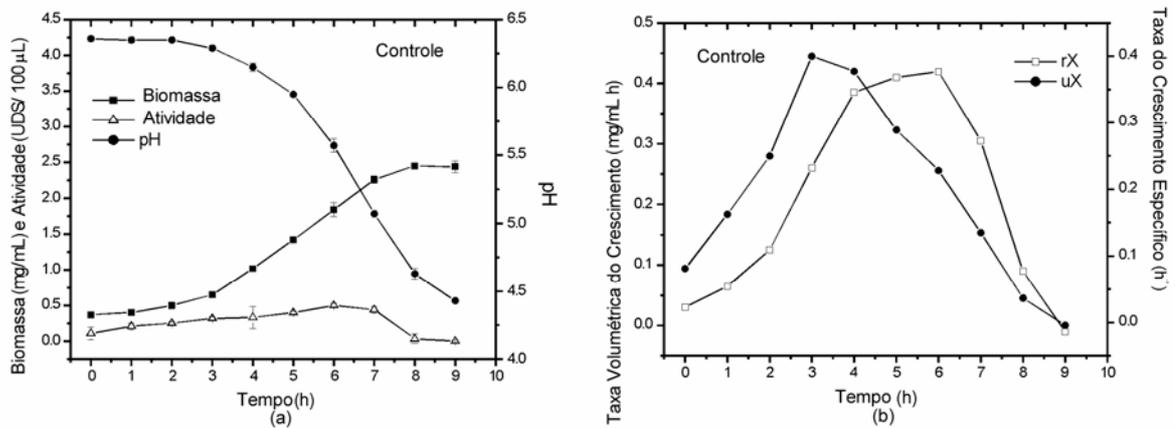


Figura 21. Evolução da concentração de biomassa, atividade enzimática, pH (a) e taxa de crescimento microbiano (b) obtido na fermentação controle do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

Os resultados apresentados nas figuras 16 a 21 evidenciam que tanto o extrato quanto o fosfato exercem forte influencia na produção e estabilidade da enzima, o que explica seu forte efeito na produção de oligossacarídeos e dextrana observado no primeiro planejamento experimental.

Dessa forma, dois ensaios foram realizados sem adição de fosfato com pH controlado a 6,5, sendo um deles com adição de extrato de levedura (Ensaio F) e outro sem adição de extrato de levedura (Ensaio G). Os resultados obtidos nestes ensaios são apresentados nas figuras 22 e 23 respectivamente.

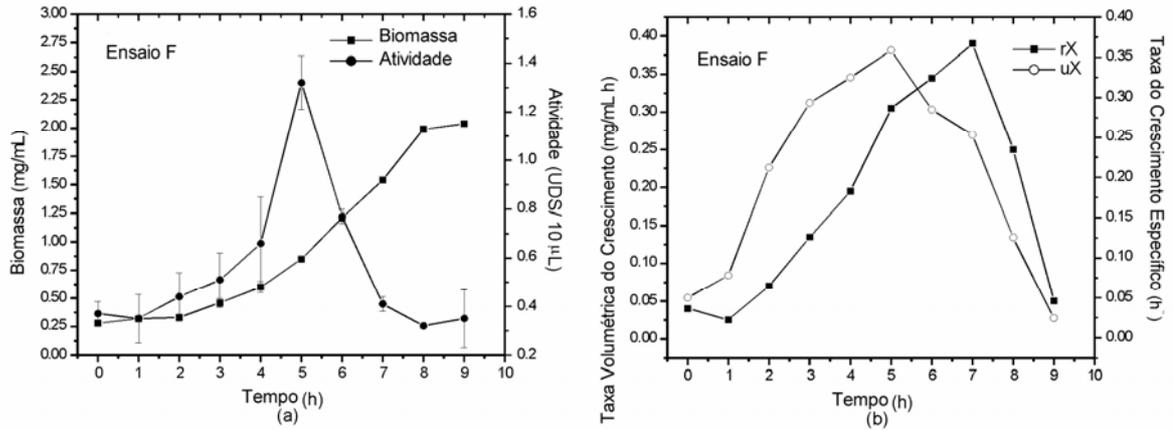


Figura 22. Evolução da biomassa e atividade enzimática (a) e taxa de crescimento microbiano (b) para fermentação com 20 g/L de extrato de levedura (sem adição de fosfato) e pH controlado a 6,5 (Ensaio F) do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

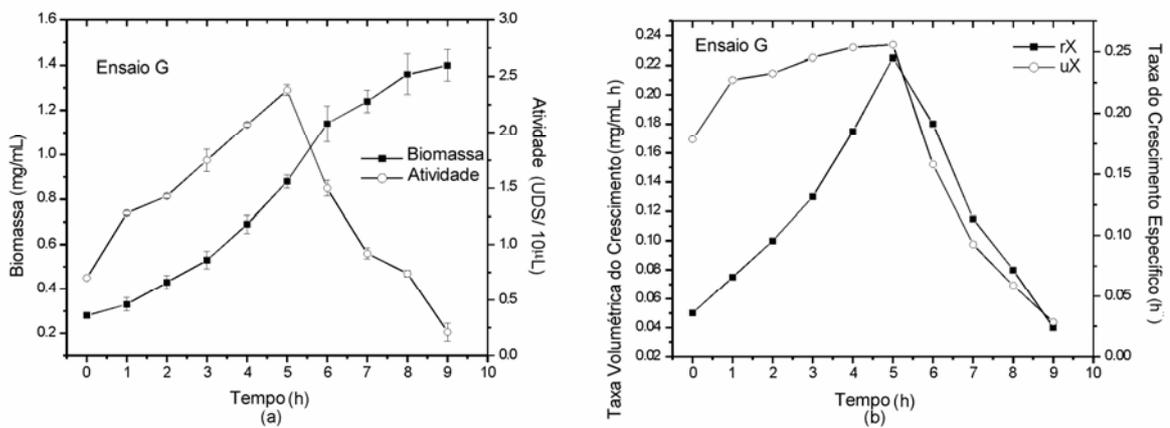


Figura 23. Evolução da biomassa e atividade enzimática (a) e taxa de crescimento microbiano (b) para fermentação sem adição de extrato de levedura nem fosfato e pH controlado a 6,5 (Ensaio G) do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

De acordo com os resultados apresentados nas figuras 20 e 21, fica evidente que a manutenção do pH em 6,5 (valor ótimo para crescimento) causa a rápida desnaturação da enzima em meios conduzidos sem adição de fosfato.

A figura 24 apresenta os resultados referentes a atividade máxima enzimática (a) e a biomassa final (b) obtidas para cada ensaio. A atividade máxima enzimática no suco fermentado de caju variou de 1.95 ± 0.01 até 2.93 ± 0.02 UDS/10 μ L. Estes valores foram 3,5 vezes a atividade máxima encontrada utilizando o meio sintético (0.50 ± 0.02 UDS/10 μ L.) Altas atividades enzimáticas foram encontradas até nos processos conduzidos sem adição de fosfato ou extrato de levedura. O ensaio B apresentou a maior atividade máxima enzimática (Figura 10a) e o controle apresentou a maior biomassa (figura 10b).

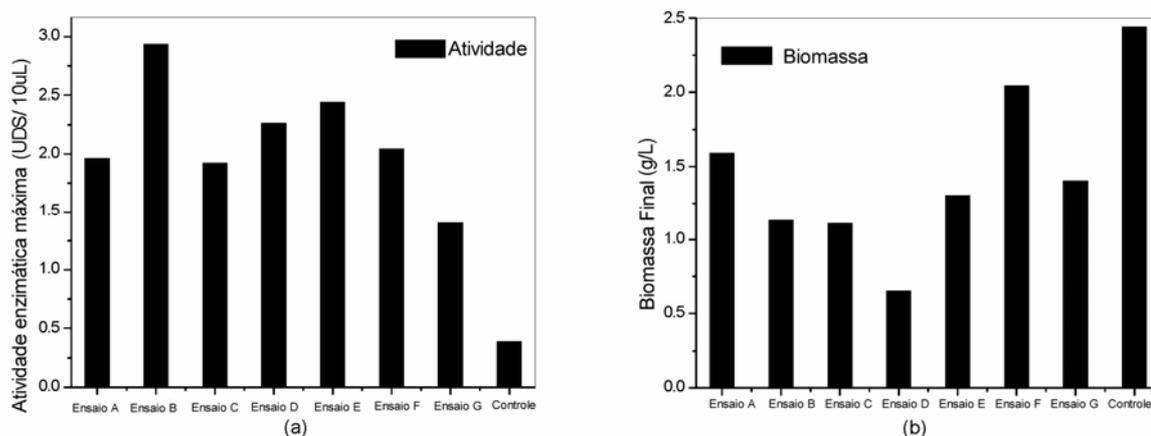


Figura 24. Comparativo entre a atividade máxima enzimática (a) e a biomassa final (b) do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B512F.

5.2.3. Variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742

Uma vez verificado o efeito positivo da adição de extrato de levedura e fosfato na estabilidade da enzima para a linhagem B512F, foi realizado um planejamento experimental para determinação dos níveis ideais destes componentes para a linhagem B742.

O planejamento fatorial inicial com o *L. mesenteroides* B742 (Tabela 8) foi avaliado através da produção de biomassa, consumo de açúcar redutor e glicose e produção de dextrana, conforme tabela 20. Pode-se constatar que os melhores resultados referentes as variáveis analisadas foram obtidos nos ensaios 4 (20 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de fosfato) e ensaio 6 (20 g/L de extrato de levedura e 12 g/L de fosfato). Estes resultados sugerem que o comportamento da linhagem B742 no processo fermentativo é similar ao da linhagem B512F, conforme resultados anteriormente apresentados.

Tabela 20. Concentração final de células, açúcar redutor residual, glicose residual e dextrana no suco fermentado de caju clarificado, com 50 g/L de açúcar redutor e 50 g/L de sacarose, no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Células (g/L)	Açúcar Redutor (g/L)	Glicose (g/L)	Dextrana (g/L)
1	0,8872	0,3752	0,3059	1,3269
2	1,4607	0,7785	0,1975	1,7273
3	1,9791	0,9853	0,0639	2,5647
4	2,2415	1,1380	0,0537	3,1108
5	1,0557	0,6136	0,2352	1,3400
6	2,0990	1,1688	0,1498	2,9773
7	1,6292	1,0877	0,2300	0,7484
8	1,8851	1,1278	0,1557	2,6537
9	1,6097	1,0337	0,2193	2,3867
10	1,8754	1,0011	0,2170	3,1432

De acordo com as tabelas de ANOVA com as análises de variância do modelo de regressão ao nível de 95% de significância, apresentadas nas tabelas 21 a 23, o valor de F obtido foi superior ao listado para a concentração final de células, açúcar redutor e glicose.

Tabela 21. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de células do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	1,6846	5	0,34	27,34
Erro	0,0493	4	0,01	
Total	1,7339	9		
Coeficiente de correlação (R^2)	0,9716			
Valor listado de F (95%)				$F_{5,4} = 6,26$

Tabela 22. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de açúcar redutor do planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	0,5779	5	0,12	12,80
Erro	0,0361	4	0,01	
Total	0,6140	9		
Coeficiente de correlação (R^2)	0,9412			
Valor listado de F (95%)				$F_{5,4} = 6,26$

Tabela 23. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de glicose no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	0,0515	5	0,01	10,27
Erro	0,0040	4	0,00	
Total	0,0555	9		
Coeficiente de correlação	0,9277			
Valor listado de F (95%)				$F_{5,4} = 6,26$

Os resultados apresentados nas figuras 25 a 28 mostram que o aumento da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura influencia diretamente o aumento da concentração celular, consumo de açúcar redutor e glicose e produção de dextrana o que evidencia a importância destes para o ensaio fermentativo cujo objetivo seja a obtenção de oligossacarídeos prebióticos. Um estudo anterior com a *L.mesenteroides* B742 reporta a produção de oligossacarídeos associada ao crescimento celular (Chung e Day, 2002).

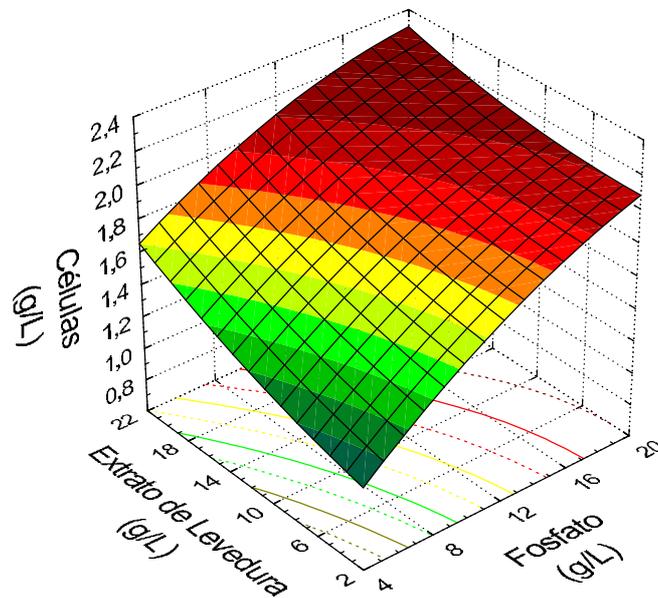


Figura 25. Concentração celular em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B742.

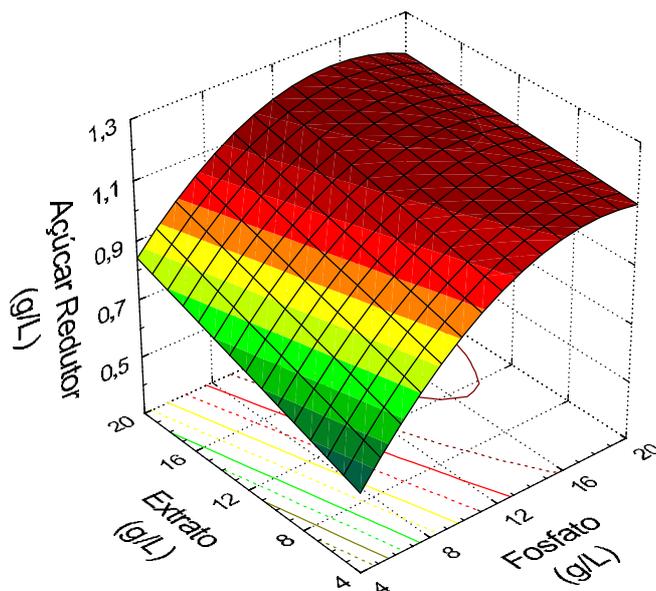


Figura 26. Açúcar redutor residual em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B742.

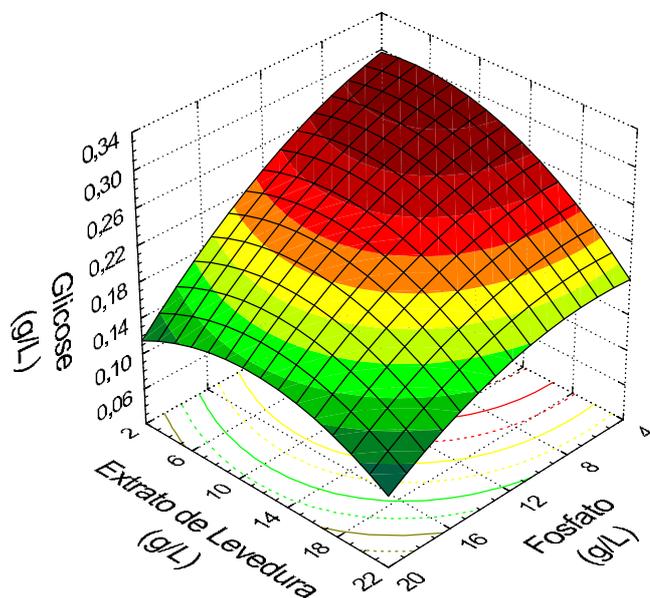


Figura 27. Concentração de glicose obtida em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio para a linhagem *L. mesenteroides* B742.

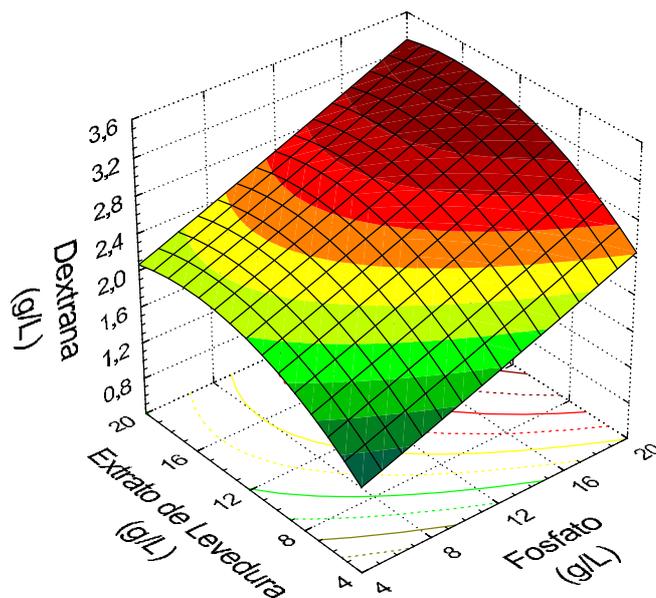


Figura 28. Dextrana produzida em função da concentração inicial de fosfato e extrato de levedura no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B742.

De acordo com os resultados apresentados, verifica-se que o aumento da concentração de extrato e fosfato favorecem a produção de dextrana. Quando a concentração de fosfato é de 20 g/L concentrações de extrato de levedura superiores a 12 g/L não exercem melhoria significativa para o crescimento microbiano e produção de dextrana. Verifica-se também que o nível de açúcar residual do meio de cultura é bem pequeno quando comparado com o inicial (Tabela 8). Neste ensaio não foi avaliada a produção de oligossacarídeos, a qual é apresentada a seguir.

5.2.4. Variação de sacarose e açúcar redutor para a linhagem *L. mesenteroides* B742

Para se verificar o efeito da variação da concentração de sacarose e aceptores para a linhagem B742 um novo planejamento experimental foi realizado (Tabela 9). Entretanto, nos ensaios com esta linhagem o nível de oligossacarídeos

produzidos ficou abaixo do limite de detecção do método utilizado para quantificação por HPLC. A produção de oligossacarídeos foi confirmada apenas pela detecção através de cromatografia em camada delgada segundo metodologia descrita no item 4.12 da seção metodologia. A técnica de CCD permite a identificação de concentrações bem menores que as detectadas por sistemas de HPLC. Os oligossacarídeos obtidos neste trabalho apresentaram grau de polimerização de 2 a 4, sendo predominantes os dissacarídeos e os trissacarídeos.

Os resultados apresentados na tabela 24, mais uma vez, sugerem que o processo fermentativo utilizando o suco de caju clarificado como substrato é viável para a produção de oligossacarídeos uma vez que se observou a produção de dextrana, aumento da concentração celular e os nutrientes foram consumidos pelo microrganismo. Pode-se constatar maior produção de dextrana no ensaios 6 que apresentava concentração de sacarose (50 g/L) um pouco maior que a de açúcar redutor (37,5 g). Não se observou variação significativa nos resultados de concentração celular e de glicose residual. A concentração de sacarose não consumida variou de 0 a $5,65 \pm 1,56$ g/L e a de frutose de $5,58$ a $16,42 \pm 3,04$ g/L.

Tabela 24. Concentração final de dextrana, células, sacarose não consumida, glicose e frutose no suco fermentado de caju no planejamento experimental com variação de sacarose e açúcar redutor para a linhagem *L. mesenteroides* B742. Fortaleza, 2006.

Ensaio	Dextrana (g/L)	Células (g/L)	Sacarose não consumida (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)
1	6,140	2,427	0,000	12,320	5,580
2	7,212	2,119	0,650	14,020	7,630
3	12,676	2,477	2,016	13,470	11,256
4	15,300	2,462	5,650	19,570	16,420
5	5,932	2,435	0,224	14,120	7,590
6	22,631	2,388	2,380	13,470	11,448
7	21,939	2,584	0,960	11,410	7,080
8	10,728	2,266	1,320	16,940	11,540
9	8,526	2,710	0,408	11,272	7,456
10	10,174	2,818	1,208	16,640	10,340

Conforme descrito nas tabelas de ANOVA com as análises de variância do modelo de regressão ao nível de 95% de significância, apresentadas nas tabelas 25 e 26, o valor de F obtido foi superior ao listado para a concentração final de sacarose não consumida e frutose.

Tabela 25. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de sacarose não consumida caju no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	22,3612	5	4,47	8,51
Erro	2,1010	4	0,53	
Total	24,4622	9		
Coeficiente de correlação	0,9141			
Valor listado de F (95%)				$F_{5,4} = 6,26$

Tabela 26. Análise da variância do modelo de regressão para a concentração final de frutose caju no planejamento experimental com variação de extrato de levedura e fosfato para a linhagem *L. mesenteroides* B742. Fortaleza, 2006.

Indicador de Variância	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F
Regressão	83,7517	5	16,75	8,12
Erro	8,2464	4	2,06	
Total	91,9980	9		
Coeficiente de correlação	0,9104			
Valor listado de F (95%)				$F_{5,4} = 6,26$

Os resultados apresentados nas figuras 29 e 30 mostram que o aumento da concentração inicial de sacarose e açúcar redutor exerce influência sobre o aumento da concentração de sacarose não consumida e frutose.

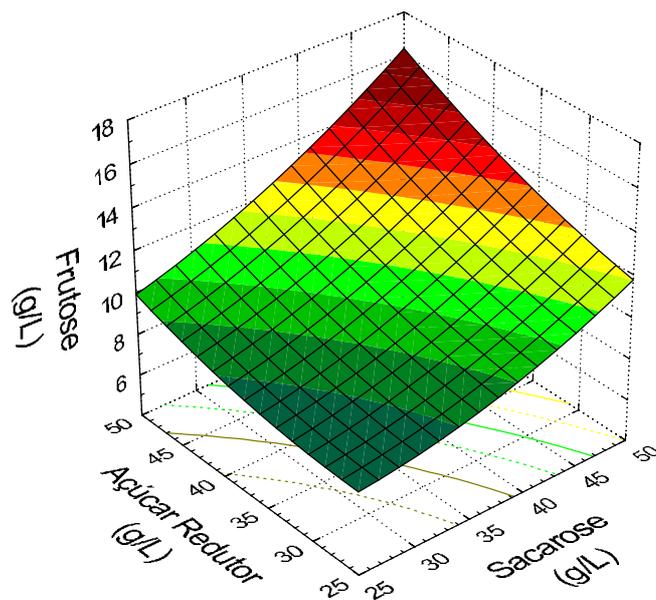


Figura 29. Concentração de frutose em função da concentração inicial de sacarose e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B742.

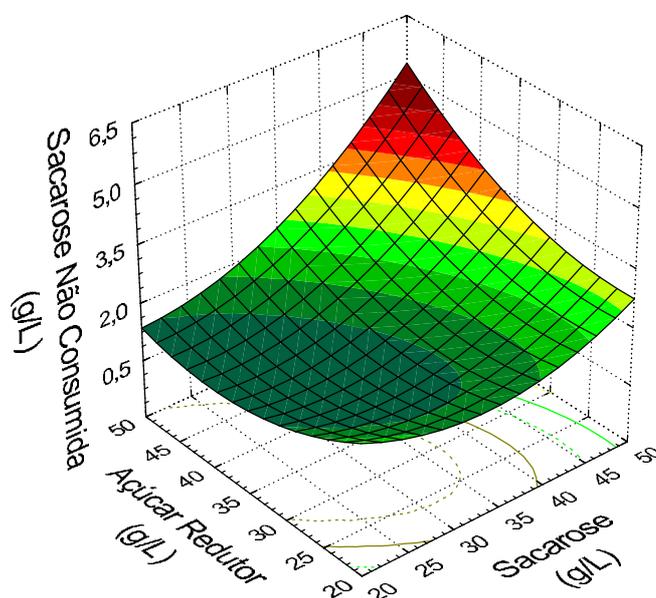


Figura 30. Concentração de sacarose não consumida em função da concentração de sacarose e açúcar redutor no meio de cultura para a linhagem *L. mesenteroides* B742.

As tabelas de efeitos e os coeficientes de regressão dos planejamentos experimentais são apresentados nos Apêndices III e IV, respectivamente.

5.3. Detecção de oligossacarídeos através de cromatografia de camada delgada (CCD)

Em todos os ensaios fermentativos constatou-se a presença de oligossacarídeos através de cromatografia de camada delgada, conforme apresentado no Apêndice V.

5.4. Estudo da aplicabilidade do produto obtido como fonte de oligossacarídeos prebióticos

Com base nos resultados apresentados na figura 31 podemos constatar que nos meios de cultura contendo sucos de caju clarificado fermentados com as linhagens B512F e B742 (C1 e C2, respectivamente) houve maior crescimento de *Lactobacillus*, sugerindo a atividade prebiótica, do que no meio contendo suco de caju não fermentado (C). Por outro lado também observou-se um aumento no crescimento de *E. coli* e *Salmonella choleraesuis*, o que pode ser justificado pela presença de nutrientes residuais do processo fermentativo que podem estar sendo utilizados por estas bactérias. Sabe-se que linhagens de *L. mesenteroides* são capazes de reduzir a frutose a manitol (Wisseelink et al., 2002). Este substrato pode ser utilizado pela *E. Coli* e *Salmonella* como fonte de carbono, explicando o crescimento superior destes microrganismos no suco fermentado quando comparado com os meios sintéticos.

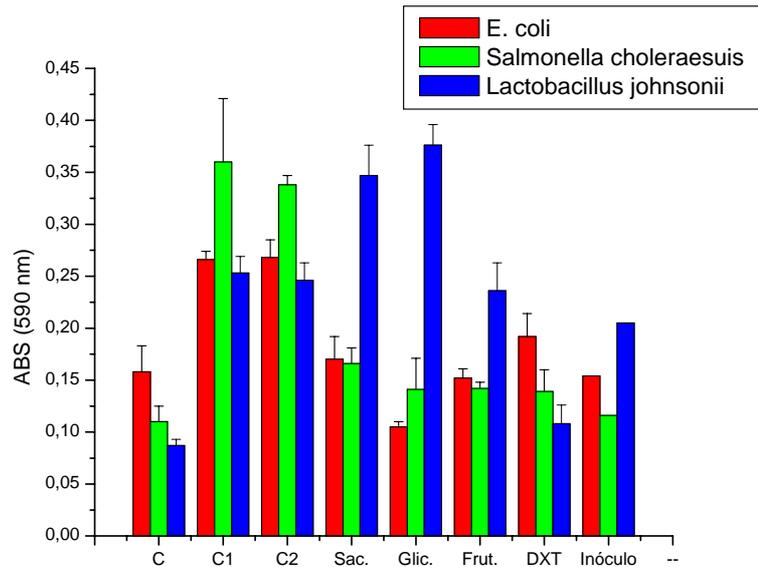


Figura 31. Avaliação do crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Lactobacillus johnsonii* em diferentes meios de cultura.

Onde:

C – Suco de caju clarificado *in natura* não fermentado

C1 – Suco de caju clarificado *in natura* fermentado com *L. mesenteroides* B512F

C2 – Suco de caju clarificado *in natura* fermentado com *L. mesenteroides* B742

Sac. – Meio sintético adicionado de sacarose em substituição a glicose (20 g/L) para o meio MRS ou a dextrose (2,5 g/L) para o meio TSB

Glic. – Meio sintético adicionado de glicose em substituição a glicose (20 g/L) para o meio MRS ou a dextrose (2,5 g/L) para o meio TSB

Frut. – Meio sintético adicionado de frutose em substituição a glicose (20 g/L) para o meio MRS ou a dextrose (2,5 g/L) para o meio TSB

Dxt. – Meio sintético adicionado de dextrana em substituição a glicose (20 g/L) para o meio MRS ou a dextrose (2,5 g/L) para o meio TSB

Inoculo - Meio sintético padrão

As figuras 32 e 33 apresentam a avaliação do crescimento de *Lactobacillus* em diferentes meios de cultura em pH 5,0 e pH 6,2, respectivamente. Podemos constatar que houve pouca diferença entre as duas condições de pH, ficando a critério do pesquisador a escolha de uma ou outra condição experimental. Vale salientar que o crescimento de *Lactobacillus johnsonii* obtido com o suco de

caju fermentado com as linhagens B742 e B512F foi bastante semelhante ao obtido com o meio sintético também fermentado com as linhagens citadas, o que evidencia a potenciabilidade do uso do suco de caju como fonte de oligossacarídeos prebióticos e mostra que é possível reduzirmos o custo para obtenção destes através do uso de substratos agrícolas regionais, além da possibilidade de agregar um novo conceito em valor comercial e funcional para a comercialização do suco de caju.

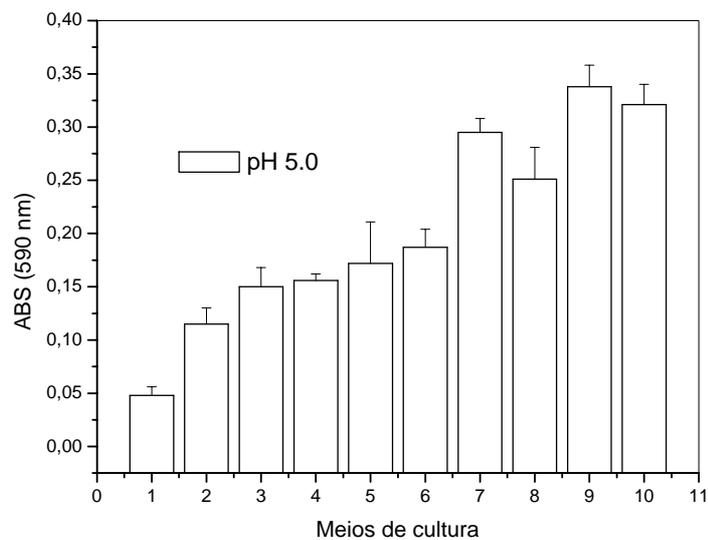


Figura 32. Avaliação do crescimento de *Lactobacillus johnsonii* em diferentes meios de cultura em pH 5,0.

Onde:

- 1 - Suco de caju clarificado *in natura* sem extrato de levedura
- 2 - Suco de caju clarificado *in natura* com extrato de levedura
- 3 - Suco de caju clarificado *in natura* fermentado com *L. mesenteroides* B512F
- 4 - Suco de caju clarificado *in natura* fermentado com *L. mesenteroides* B742
- 5 - Meio sintético fermentado com *L. mesenteroides* B512F
- 6 - Meio sintético fermentado com *L. mesenteroides* B742
- 7 - Meio MRS com adição de 4 g/L de glicose e 3 g/L de frutose
- 8 - Meio MRS com adição de 3 g/L de glicose e 4 g/L de frutose
- 9 - Meio MRS com adição de 10 g/L de glicose e 9 g/L de frutose
- 10 - Meio MRS com adição de 9 g/L de glicose e 17g/L de frutose

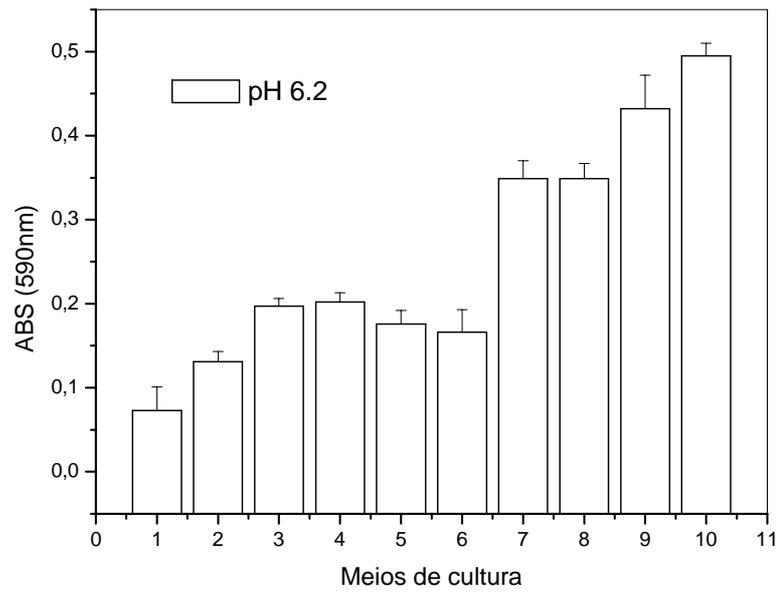


Figura 33. Avaliação do crescimento de *Lactobacillus johnsonii* em diferentes meios de cultura em pH 6,2.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o processo fermentativo utilizando o suco de caju como substrato apresentou bons resultados, principalmente no que se refere ao crescimento microbiano, produção da enzima dextrana-sacarase e crescimento de *Lactobacillus* sendo sua utilização, portanto viável.

Pode-se sugerir que uma vez que o *Leuconostoc mesenteroides* encontra condições ótimas para o seu crescimento é possível ajustar o pH do meio para que a atividade enzimática seja otimizada e, dando continuidade ao processo com alimentação de substrato de forma que bons resultados relativos à produção de oligossacarídeos prebióticos poderão ser obtidos. Os resultados obtidos sugerem que a estabilidade da enzima em baixos valores de pH é maior no suco de caju quando comparada com o meio sintético.

Dentre os substratos utilizados, o *Leuconostoc mesenteroides* apresentou tendência maior de consumo de sacarose. Como este substrato é necessário à síntese dos oligossacarídeos, uma alimentação com sacarose poderá resultar em bom rendimento.

Os resultados evidenciaram que houve maior produção de oligossacarídeos produzidos em relação a dextrana.

O suco de caju clarificado *in natura* fermentado com a linhagem *L. mesenteroides* B512F e B742 apresentou atividade prebiótica superior à observada no suco de caju clarificado *in natura* não fermentado e no meio sintético.

Não foi constatada diferença expressiva em termos de eficácia de atividade prebiótica dos oligossacarídeos ramificados obtidos com a linhagem do

Leuconostoc mesenteroides B742 os oligossacarídeos lineares obtidos com a linhagem B-512F.

Fica patente a necessidade de dar continuidade aos estudos referentes a utilização do suco de caju como fonte de oligossacarídeos prebióticos, especialmente no tocante a otimização do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F.A.P. **Cajuina**. In: Venturini Filho, W.G. (Org.) Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado. São Paulo: Editora Edgard Blücher, cap. 8. p.169-184, 2006.

AGUIAR, L.P. **β -caroteno, vitamina C e outras características de qualidade de acerola, caju e melão em utilização no melhoramento genético**. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 86p. Dissertação (Mestrado), 2001.

ALSOP, L. Industrial Production of Dextran. **Progress in Industrial Microbiology**, v.18, p.1-44, 1983.

AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M. DRI. Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 71-78, 2001.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemistry: Vitamins and other nutrients**. Washington: AOAC. Chapter 45, p. 4,1992.

ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. **Caju in natura** (*Anacardium occidentale* L.) – carotenóides e vitamina C. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Fortaleza. 2000. **Resumos**. Fortaleza: SBCTA, v. 2, n. 5, p. 101, 2000.

AZOUBEL, P. M.; CIPRIANI, D. C.; EL-AOUAR, A. A.; ANTONIO, G. C; MURR, F. E. X. Effect of concentration on the physical properties of cashew juice. **Journal of Food Engineering**, v.66, p.413-417, 2005.

BARROS, R. V. **Cultura do cajueiro** (*Anacardium occidentale* L.). Disponível em:<<http://www.emepa.org.br/cajucultura.php>>. Acesso em: 28 fev. 2007.

BARROS NETO, B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E., **Como Fazer Experimentos**, Campinas: Editora da UNICAMP, 2.ed., 2002, 401 p.

BELLISLE, F.; DIPLOCK, A.T. *et al.* Functional food science in Europe. **British Journal of Nutrition**, v. 80, S1-S193, 1998.

BORGES, V.C. **Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos**. IN: WAITZBERG, D.L. *Nutrição Oral, Enteral e parenteral na Prática Clínica*. 3. ed. v.2. São Paulo, Atheneu, 2002, 1495-1509.

BRASIL. Portaria ANVISA n.º 398, de 30 de abril de 1999. **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 maio 1999a.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA n.º 17, de 30 de abril de 1999. **Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 maio 1999b.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA n.º 18, de 30 de abril de 1999. **Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 maio 1999c.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA n.º 19, de 30 de abril de 1999. **Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 maio 1999d.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 136, de 30 de abril de 1999. **Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de frutas**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2000.

CHUNG; C.H.; DAY, D.F. Glucooligoasaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): A potential Prebiotic. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v 2, p.196-199, 2002.

CHUNG; C.H.; DAY, D.F. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a Poultry Prebiotic. **Poultry Science Association, Research Note**, p. 1302-1306, April, 2004.

CIANCI, F. C.; SILVA, L. F. M.; CABRAL, L. M. C. *et al.* Clarification and concentration of cashew apple juice by membrane processes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p.579-583, jul./sep., 2005.

COLLI, C.; SARDINHA, F; FILISETTI, T. M. C. C. **Alimentos funcionais**. IN: CUPPARI, L. *Nutrição Clínica no Adulto*. São Paulo, Manole, 2002, p.55-70.

COSTA, M. C. O. da. **Estudo da estabilidade do suco de caju (*Anacardium occidentale L.*) preservado pelos processos hot fill e asséptico**. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 81p. Dissertação (Mestrado), 1999

COSTA, T. S. A.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina *versus* método do butanol ácido. **Química Nova**, v. 26, n. 5, São Paulo, set./ out. 2003.

COURI, S; MENEZES, L. F.; PINTO, G. A. S.; SOUZA, M. L. M; FREITAS, S. P. Comparação entre os tratamentos com tanase e com gelatina para clarificação do suco de caju (*Anacardium occidentale L.*) **Boletim da CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 41-54, jan./jun., 2002.

CRISÓSTOMOS, L. A.; SANTOS, F. J. S.; OLIVEIRA, V. H.; RAIJ, B. V.; BERNARDI, A. C. C.; SILVA, C. A.; SOARES, I. **Cultivo do cajueiro anão precoce: aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 20p.

DEMUTH, K.; JÖRDENING, H.; BUCHHOLZ, K. Oligosaccharide synthesis by dextransucrase: new unconventional acceptors. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1811-1820, 2002.

DIPLOCK A.T., AGGETT P.J., ASHWELL M., BORNET F., FERN E.B., ROBERFROID M.B.. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. **British Journal of Nutrition**. v. 81; Suppl. 1: S1-S27, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, P.A.; REBERS, P.A.; SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, **Analytical Chemistry**. 28, 1956, p. 350-356.

EMBRAPA. **Suco de caju clarificado**. Disponível em: < http://www.embrapa.br/linhas_de_acao/temas_basicos/agroindustria/> Acesso em: 15/03/2007

ETTINGER, S. **Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos**. IN: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 10. ed., São Paulo, Rocca, 2002, 30-64.

FAGUNDES, R.L.M.; COSTA, Y.R. Uso dos alimentos funcionais na alimentação. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 108, p.42-48, 2003.

FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MOSCA, J. L. *et al.* Cashew apple for fresh consumption: researche on harvest and postharvest technology in Brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, 485, 1999. p. 155-160.

FRANCO. G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9ª ed. Editora Atheneu, 1998. 121 p.

GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gum microflora using the prebiotic oligofrutose and inulin. **The Journal of Nutrition**, n. 7, p. 1438-1441, 1999.

GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI, R.C.; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. **Boletim da CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, jul./dez. 2004.

GUIMARÃES, D.R.B.; COSTA, F. A.A., RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F. Optimization of Dextran Synthesis and Acidic Hidrolisys by Surface Response Analysis. **Brazilian Journal of Chemistry Engineering**, v.16, n.2, p.129-139, june 1999.

HASLER C.M. The changing face of functional foods. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, Suppl. 5: 499S-506S, 2000.

HEINCKE K.; DEMUTH B.; JÖRDENIN H.J.; BUCHHOLZ K. Kinetics of the Dextranucrase Acceptor with Maltose – experimental results and modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p.523-534, 1999.

HIDAKA, H. *et al.*, Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human healthy. **Bifidobacteria Microflora**, v.10, n. 1, p. 65-79, 1991.

HIGASHIMURA, Y.; EMURA, K.; KUZE, N.; SHIRAI, J.; KODA, T. **Canadian Patent 2 378 464**, 2000.

HONORATO, T. L.; RABELO, M.C.; GONÇALVES, L. R.B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Produção de dextrana-sacarase utilizando substratos alternativos. **Anais do XV SINAFERM**, Recife –PE, 2005.

HONORATO, T. L.; CHAGAS, C.M.A.; GONÇALVES, L. R.B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da fermentação de suco de caju para síntese de oligossacarídeos pré-bióticos. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química; III Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada – CBTERMO**. São Paulo –SP, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed., v. 1, São Paulo, 1985.

JACOBSON M. Functional foods: health boon or quackery? **British Medical Journal** 319:205-206, 1999.

LEITE, L.A. **A agroindústria do caju no Brasil: políticas públicas e transformações econômicas**. Fortaleza: Embrapa/CNPAT, 1994. 195p.

MACHADO, F.M.S.; SANTIAGO, V.R. **Os benefícios do consumo de alimentos funcionais**. IN: TORRES, E.A.F.; MACHADO, F.M.S. Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns. São Paulo: Ponto Crítico, p.35-43, 2001.

MACHIDA, Y., FUKUI, F., KOMOTO, T. **European Patent** 0 242 459, 1986.

MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S; GUIMARÃES, A. C. L. Estudo da estabilidade físico-química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p.43-46, 2001.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MARRIOTT, B.M. Functional Foods: an ecological perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**. V. 71, n.6, 1728S – 1734S, 2000.

MIBIELLI, G.M. **Síntese do Processo de Obtenção de Dextrana de Clínica e Frutose a partir de Sacarose.** Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Dissertação (Mestrado), 2001.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n3, p. 426-428, march 1959.

MILNER, J. A. Functional foods and health promotion. **The Journal of Nutrition**, 1395S-7S, 1999.

MIYAKE, T., MIKIHICO, Y., KANO, T. **United States Patent 4 518 518**, 1985.

MOLIS, C. *et al.* Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p. 324-328, 1996.

MOURA, C. F. H. **Qualidade de pedúnculo de clones de cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) irrigados.** Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 56p. Dissertação (Mestrado), 1998.

OLIVEIRA, V. H.; ANDRADE, A. P. S. **Produção integrada de caju – abrindo portas para a qualidade.** Disponível em: <
<http://caju.cnpat.embrapa.br/pif/artigos/agroanalyse/index.html>> Acesso em:
31/12/2006.

PEREIRA, P.C.; MESQUITA, M.F.; RAYSSIGUIER, Y. **Estudo nutricional dos ecótipos de feijão cultivados na serra de peneda para produção de alimentos funcionais.** Disponível em: <
http://www.ardal.pt/modules/xt_conteudo/index.php?id=16 > Acesso em:
05/03/2007

PERTINARI, R. A.; TARSITANO, M. A. A. Comercialização de caju *in natura* na região noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 697-699, 2002.

PINHEIRO, A. M., FERNANDES, A. G., FAI, A. E. C. *et al.* Chemical, physico-chemical and microbiological evaluation of single strenght fruit juices: pineapple, cashew apple and passion. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2006.

RABELO, M.C.; HONORATO, T.L.; GONÇALVES, L.R.B; PINTO, G.A.S.; RODRIGUES, S. Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 133 p. 21-40, 2006.

ROBERFROID, M. *et al.* The biochemistry of oligofrutose, a nondigestible fiber: An approach to calculate its calorie value. **Nutrition Review**, v. 51, n. 137, 1993.

ROBERFROID M. Functional foods concept and its application for prebiotics. **Digest Liver Disease**. v. 34; Suppl. 2: S105-S10, 2002.

ROBYT, J.F. **Thin layer chromatography**, Encyclopedia of separation science, v. 5, p. 2235-2244, Editors I.D. Wilson, M. Cooke C.F, Poole, 2000.

RODRIGUES, S. **Estudo da Síntese Enzimática de Dextrana na Presença de Maltose como Aceptor**. Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas, 100. 250p. Tese (Doutorado), 2003.

RODRIGUES, S.; LONA, L.M.F.A; FRANCO, T.T. Effect of phosphate concentration on the production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* B512F. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v 26, n.1, p.57-62, 2003.

RODRIGUES, S.; LONA, L.M.F.A; FRANCO, T.T. Factorial design and simulation of panose production: dextransucrase acceptor reaction. **Proceedings of 16th**

International Congress on Chemical Engineering and Process Engineering (CHISA 2004), Prague, Czech Republic, 2004a.

RODRIGUES, S.; LONA, L.M.F A; FRANCO, T.T. Study of dextran enzymatic synthesis using maltose as acceptor: yield and molecular weight. **Proceedings of 16th International Congress on Chemical Engineering and Process Engineering** (CHISA 2004), Prague, Czech Republic, 2004b.

RODRIGUES, S; LONA, L. M. F.; FRANCO, T.T. Optimizing panose production by modeling and simulation using factorial design and surface response analysis. **J Food Eng** v. 75, p. 433-440, 2006.

SANCHO, S. O. **Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L)**. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 137p. Dissertação (Mestrado), 2006.

SANTOS, R. P.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, R. P; FREIRE, V.N. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.1432-1437, 2007.

SEGURA, A. G.; ALCALDE, M.; YATES, M.; ROJAS-CERVANTES, M. L.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Immobilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B512F on eupergit C supports. **Biotechnology Progress**, v. 20, p.1414-1420, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, E. M. F. da. **Estudos sobre o mercado de frutas**. São Paulo: FIPE, 1999. 373p.

SILVA, R. A. **Desenvolvimento e estabilidade de néctar de caju (*Anacardium occidentale* L) adoçado com mel de abelha *Apis mellifera***. Departamento de

Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 74p. Dissertação (Mestrado), 2006.

SOARES, L. C. **Obtenção de bebida funcional a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) e extrato de guaraná (*Paullinia cupara sorbilie Mart. Ducke*)**. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará. Dissertação (Mestrado), 1996.

SOARES, L. C.; OLIVEIRA, G. S. F.; MAIA, G. A. *et al.* Obtenção de bebida a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale*) e extrato de guaraná (*Paullinia cupana sorbilis mart. ducke*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 387-390. 2001

SOUZA FILHO, M. S. M. **Aspectos físicos, químicos, físico-químicos e tecnológicos de diferentes clones de caju (*Anacardium occidentale*)**. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 196p. Dissertação (Mestrado), 1987.

SOUZA, P. A.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; MENDONÇA, V. S. Caracterização Química de Pedúnculos de Caju 'CCP-76' em Diferentes Estádios de Desenvolvimento In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Belém. 2002. **Resumos...** Belém: SBCTA, p. 158, 2002.

SKLIUTAS, A. R.; SHIBUYA, D. S.; ALVES, G. L.; LAPA-GUIMARÃES, J.; LISBOA, M. A. de M.; PEREIRA, M. A. G.; RÚA, N. E. R.; SILVA, M. A. A. P. da. Desenvolvimento de terminologia descritiva e perfil sensorial de suco de caju. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Fortaleza. 2000. **Resumos....** Fortaleza: SBCTA, v. 2, n. 3, p. 130, 2000.

USDA – Nutrient Database for Standard, 2002. Disponível em:<<http://www.usda.gov>>. acesso em: 25 fev. 2007.

WAITZBERG, D.L.; GALIZIA, M. S. **Carboidratos**. IN: WAITZBERG, D.L. *Nutrição Oral, Enteral e parenteral na Prática Clínica*. 3. ed. v.1. São Paulo, Atheneu, 2002, 15-33.

WISSELINK, H.W.; WEUSTHUIS, R.A.; EGGINK, G.; HUGENHOLTZ, J.; GORBBEN, J.H; Mannitol production by lactic acid bacteria: a review, **International Dairy Journal**, v. 12 p. 151-161, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Meio de Cultura Agar (Caldo) de Man, Rogosa & Sharpe (MRS)

Aplicação: meio de cultivo para bactérias lácticas

Composição Caldo	
Peptona	10,0g
Extrato de Carne	8,0g
Extrato de Levedura	4,0g
Glicose	20,0g
Sorbitano monooleato	1,0g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	2,0g
Acetato de sódio. $3H_2O$	5,0g
Citrato de Amônia	2,0g
Sulfato de magnésio. $7H_2O$	0,2g
Sulfato de manganês. $4H_2O$	0,05g
Água destilada	1 litro
PH 6,2, 121°C / 15 min	

Fonte: Silva, Junqueira e Silveira, 1997

Meio de Cultura Agar (Caldo) Trypticase de Soja (TSA/TSB)

Aplicação: meio de enriquecimento e manutenção para uso geral

Composição Caldo	
Peptona de caseína	17,0g
Peptona de soja	3,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄)	2,5g
Dextrose	2,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,3 121°C/15 min	

Fonte: Silva, Junqueira e Silveira, 1997

APÊNDICE III

Tabelas de Efeitos dos Planejamentos Experimentais

- a) Efeitos em relação à Dextrana do planejamento experimental com a linhagem B512F das variáveis: sacarose, açúcar redutor (AR), extrato de levedura, fosfato e sal.

	Efeito	Std.Err.	t(3)	p
Mean/Interc.	2,4933	0,0510	48,8852	0,0000
(1)SACAROSE	0,6675	0,1082	6,1694	0,0086
(2)AR	0,6225	0,1082	5,7535	0,0104
(3)EXTRATO	1,3525	0,1082	12,5005	0,0011
(4)FOSFATO	0,8275	0,1082	7,6482	0,0046
(5)SAL	0,0575	0,1082	0,5314	0,6319

- b) Efeito em relação aos Oligossacarídeos do planejamento experimental com a linhagem B512F das variáveis: sacarose, açúcar redutor (AR), extrato de levedura, fosfato e sal.

	Efeito	Std.Err.	t(3)	p
Mean/Interc.	5,7644	0,3007	19,1710	0,0003
(1)SACAROSE	-0,2900	0,6379	-0,4547	0,6802
(2)AR	0,9350	0,6379	1,4659	0,2389
(3)EXTRATO	3,5350	0,6379	5,5420	0,0116
(4)FOSFATO	2,0800	0,6379	3,2610	0,0471
(5)SAL	0,9500	0,6379	1,4894	0,2331

- c) Efeito em relação à Biomassa do planejamento experimental com a linhagem B512F das variáveis: sacarose, açúcar redutor (AR), extrato de levedura, fosfato e sal.

	Efeito	Std.Err.	t(3)	p
Mean/Interc.	2,1478	0,0321	66,9276	0,0000
(1)SACAROSE	-0,1050	0,0681	-1,5424	0,2206
(2)AR	-0,0950	0,0681	-1,3955	0,25720
(3)EXTRATO	0,3600	0,0681	5,2883	0,0132
(4)FOSFATO	0,6700	0,0681	9,8420	0,0022
(5)SAL	0,1250	0,0681	1,8362	0,1637

- d) Efeitos em relação à Concentração Celular (Biomassa) do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Efeito	Std.Err.	t(4)	p
--	---------------	-----------------	-------------	----------

Mean/Interc.	1,7282	0,0663	26,0501	0,0000
(1)FOSFATO (L)	0,9720	0,0906	10,7238	0,0004
FOSFATO (Q)	-0,2731	0,1453	-1,8789	0,1335
(2)EXTRATO (L)	0,3640	0,0906	4,0155	0,0159
EXTRATO (Q)	0,0866	0,1453	0,5955	0,5836
1L by 2L	-0,1555	0,1110	-1,4010	0,2338

e) Efeitos em relação à Concentração de Açúcar Redutor do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Efeito	Std.Err.	t(4)	p
Mean/Interc.	1,0638	0,0568	18,7341	0,0000
(1)FOSFATO (L)	0,5083	0,0776	6,5514	0,0028
FOSFATO (Q)	-0,4379	0,1244	-3,5201	0,0244
(2)EXTRATO (L)	0,1987	0,0776	2,5613	0,0625
EXTRATO (Q)	-0,0048	0,1244	-0,0385	0,9711
1L by 2L	-0,1253	0,0950	-1,3185	0,2578

f) Efeitos em relação à Concentração de Glicose do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Efeito	Std.Err.	t(4)	P
Mean/Interc.	0,2215	0,0189	11,7065	0,0003
(1)FOSFATO (L)	-0,1571	0,0259	-6,0750	0,0037
FOSFATO (Q)	-0,0649	0,0415	-1,5664	0,1923
(2)EXTRATO (L)	-0,0643	0,0259	-2,4882	0,0676
EXTRATO (Q)	-0,0643	0,0415	-1,5498	0,1961
1L by 2L	0,0491	0,0317	1,5500	0,1961

g) Efeitos em relação à Dextrana do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Efeitos	Std.Err.	t(4)	p
Mean/Interc.	-0,2026	1,3064	-0,1551	0,8843
(1)FOSFATO (L)	0,0762	0,1736	0,4389	0,6834
FOSFATO (Q)	0,0002	0,0066	0,0359	0,9731
(2)EXTRATO (L)	0,2185	0,1736	1,2589	0,2765

EXTRATO (Q)	-0,0069	0,0066	-1,0423	0,3561
1L by 2L	0,0006	0,0051	0,1123	0,9160

- h) Efeitos em relação à Dextrana do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Efeito	Std.Err.	t(4)	p
Mean/Interc.	12,4739	3,7308	3,3435	0,0287
(1)SACAROSE(L)	10,4409	5,0972	2,0484	0,1099
SACAROSE(Q)	-2,6322	8,1737	-0,3220	0,7636
(2)AR (L)	-2,5053	5,0972	-0,4915	0,6488
AR (Q)	1,4716	8,1737	0,1800	0,8659
1L by 2L	0,7759	6,2428	0,1243	0,9071

- i) Efeitos em relação à Concentração Celular e coeficientes de regressão do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Effect	Std.Err.	t(4)	P
Mean/Interc.	2,6786	0,0870	30,7965	0,0000
(1)SACAROSE(L)	0,1147	0,1188	0,9654	0,3890
SACAROSE(Q)	-0,3632	0,1906	-1,9061	0,1293
(2)AR (L)	-0,2135	0,1188	-1,7968	0,1468
AR (Q)	-0,3369	0,1906	-1,7678	0,1518
1L by 2L	0,1466	0,1455	1,0070	0,3709

- j) Efeitos em relação à Sacarose não consumida do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Effect	Std.Err.	t(4)	P
Mean/Interc.	0,6809	0,4331	1,5720	0,1910
(1)SACAROSE(L)	3,0573	0,5917	5,1666	0,0067
SACAROSE(Q)	1,4966	0,9489	1,5772	0,1899
(2)AR (L)	1,5480	0,5917	2,6160	0,0590
AR (Q)	1,1726	0,9489	1,2357	0,2842
1L by 2L	1,4920	0,7247	2,0587	0,1086

- k) Efeitos em relação à Glicose do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Effect	Std.Err.	t(4)	P
Mean/Interc.	13,7186	1,3700	10,0136	0,0006
(1)SACAROSE(L)	2,0167	1,8718	1,0774	0,3419
SACAROSE(Q)	0,6277	3,0015	0,2091	0,8446
(2)AR (L)	4,4433	1,8718	2,3739	0,0765

AR (Q)	1,3877	3,0015	0,4623	0,6679
1L by 2L	2,2000	2,2924	0,9597	0,3916

- l) Efeitos em relação à Frutose do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Effect	Std.Err.	t(4)	p
Mean/Interc.	8,8150	0,8581	10,2731	0,0005
(1)SACAROSE(L)	6,1080	1,1723	5,2101	0,0065
SACAROSE(Q)	1,5740	1,8799	0,8373	0,4496
(2)AR (L)	3,8913	1,1723	3,3193	0,0294
AR (Q)	1,1560	1,8799	0,6149	0,5719
1L by 2L	1,5570	1,4358	1,0844	0,3392

APÊNDICE IV

Tabelas de Coeficientes de Regressão dos Planejamentos Experimentais

- a) Coeficientes de Regressão referentes à Dextrana do planejamento experimental com a linhagem B512F das variáveis: sacarose, açúcar redutor (AR), extrato de levedura, fosfato e sal.

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	-0,5604
(1)SACAROSE	0,0267
(2)AR	0,0249
(3)EXTRATO	0,0676
(4)FOSFATO	0,0414
(5)SAL	0,0006

- b) Coeficientes de Regressão referentes aos Oligossacarídeos do planejamento experimental com a linhagem B512F das variáveis: sacarose, açúcar redutor (AR), extrato de levedura, fosfato e sal.

	Coefficientes de Regressão
Mean/Interc.	1,5144
(1)SACAROSE	-0,0116
(2)AR	0,0374
(3)EXTRATO	0,1768
(4)FOSFATO	0,1040
(5)SAL	0,0095

- c) Coeficientes de Regressão referentes à Biomassa do planejamento experimental com a linhagem B512F das variáveis: sacarose, açúcar redutor (AR), extrato de levedura, fosfato e sal.

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	1,8703
(1)SACAROSE	-0,0042
(2)AR	-0,0038
(3)EXTRATO	0,0180
(4)FOSFATO	0,0335

(5)SAL	0,0013
---------------	--------

- d) Coeficientes de Regressão referentes à Concentração Celular (Biomassa) do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Coeficiente de Regressão
Mean/Interc.	0,3414
(1)FOSFATO (L)	0,1265
FOSFATO (Q)	-0,0021
(2)EXTRATO (L)	0,0211
EXTRATO (Q)	0,0007
1L by 2L	-0,0012

- e) Coeficientes de Regressão referentes à Concentração de Açúcar Redutor do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Coeficiente de Regressão
Mean/Interc.	-0,1054
(1)FOSFATO (L)	0,1256
FOSFATO (Q)	-0,0034
(2)EXTRATO (L)	0,0251
EXTRATO (Q)	0,0000
1L by 2L	-0,0010

- f) Coeficientes de Regressão referentes à Concentração de Glicose do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Coeficiente de Regressão
Mean/Interc.	0,2975
(1)FOSFATO (L)	-0,0022
FOSFATO (Q)	-0,0005
(2)EXTRATO (L)	0,0034
EXTRATO (Q)	-0,0005
1L by 2L	0,0004

- g) Efeitos em relação à Dextrana do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: fosfato e extrato de levedura.

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	-0,2026
(1)FOSFATO (L)	0,0762
FOSFATO (Q)	0,0002
(2)EXTRATO (L)	0,2185
EXTRATO (Q)	-0,0069
1L by 2L	0,0006

- h) Coeficientes de Regressão referentes à Dextrana do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	-1,1605
(1)SACAROSE(L)	0,9562
SACAROSE(Q)	-0,0084
(2)AR (L)	-0,5465
AR (Q)	0,0047
1L by 2L	0,0025

- i) Coeficientes de Regressão referentes à Concentração Celular e coeficientes de regressão do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	0,3359
(1)SACAROSE(L)	0,0742
SACAROSE(Q)	-0,0012
(2)AR (L)	0,0547
AR (Q)	-0,0011
1L by 2L	0,0005

- j) Coeficientes de Regressão referentes à Sacarose não consumida do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	12,4980
(1)SACAROSE(L)	-0,4159
SACAROSE(Q)	0,0048
(2)AR (L)	-0,3985
AR (Q)	0,0038
1L by 2L	0,0048

k) Coeficientes de Regressão referentes à Glicose do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	22,9980
(1)SACAROSE(L)	-0,3340
SACAROSE(Q)	0,0020
(2)AR (L)	-0,4193
AR (Q)	0,0044
1L by 2L	0,0070

l) Coeficientes de Regressão referentes à Frutose do planejamento experimental com a linhagem B742 das variáveis: sacarose e açúcar redutor

	Coefficiente de Regressão
Mean/Interc.	13,1075
(1)SACAROSE(L)	-0,3203
SACAROSE(Q)	0,0050
(2)AR (L)	-0,3086
AR (Q)	0,0037
1L by 2L	0,0050

APÊNDICE V

Oligossacarídeos detectados através da cromatografia de camada delgada

