



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

**CLÁUDIA PATRÍCIA MOURÃO LIMA FONTES**

**PRODUÇÃO DE MANITOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO SUCO  
DE CAJU UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁTICAS HETEROFERMENTATIVAS**

Fortaleza-Ceará  
2009

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

**CLÁUDIA PATRÍCIA MOURÃO LIMA FONTES**

**PRODUÇÃO DE MANITOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO SUCO DE CAJU  
UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁTICAS HETEROFERMENTATIVAS.**

**FORTALEZA  
2009**

**CLÁUDIA PATRÍCIA MOURÃO LIMA FONTES**

**PRODUÇÃO DE MANITOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO SUCO DE CAJU  
UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁTICAS HETEROFERMENTATIVAS.**

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

Orientador: Profa. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA  
2009

F765p Fontes, Cláudia Patrícia Mourão Lima  
Produção de manitol a partir da fermentação do suco de caju  
Utilizando bactérias lácticas heterofermentativas / Cláudia Patrícia  
Mourão Lima Fontes, 2009.  
77 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues  
Área de concentração: Ciência e tecnologia de alimentos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro  
de Ciências Agrárias. Depto. de Engenharia de Alimentos, Fortaleza,  
2009.

1. *Leuconostoc mesenteroides*. 2. Suco de caju. 3. Sulfato de  
amônio. 4. Manitol. I. Rodrigues, Sueli (orienta.). II. Universidade  
Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos  
III. Título.

CDD 664

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

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Cláudia Patrícia Mourão Lima Fontes

Dissertação aprovada em 31 de março de 2009.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

---

Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CNPAT

*Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais **Juvenal** e **Ester**, pelo carinho, incentivo ao longo dos meus estudos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo grande dom da vida e por estar sempre presente e iluminando meus passos.

Agradeço ao meu pai Juvenal pelo apoio afetivo e incentivo ao longo de minha vida.

À minha querida mãe Ester pelo amor, carinho, amizade e estar presente em todos os momentos de minha vida, incentivando-me.

Ao meu irmão Ésquilo, pelo grande carinho, apoio e por ser um grande exemplo de dedicação, perseverança e caráter, no qual me inspiro para sempre lutar pelo melhor possível.

Ao meu irmão Pedro pelo maravilhoso presente de Deus que representa para toda nossa família e pelas alegrias que nos proporciona.

A todos os meus familiares, especialmente a tia Fransca, pelas orações e carinho que sempre me acompanharam ao longo da minha vida.

Agradeço imensamente minha orientadora, Prof. Dra. Sueli Rodrigues, pela amizade, ensinamentos, paciência, constante incentivo e confiança.

A Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo e ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto que gentilmente aceitaram o convite de participar desta banca de defesa, contribuindo assim, para o enriquecimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Anaísa, Anita, Carol, Imylena, Isabel, Jamille, Jéssica, Luis Carlos, Mauro, Mayra, Raquel, Thatyane, Simone e Soraya, pelo carinho, amizade e pela ótima convivência.

À Cristiane Rabelo, pelo grande apoio, paciência, ensinamentos e colaboração no trabalho realizado, além de sua amizade.

À Mariana Santiago, por sua fundamental contribuição para realização deste trabalho, amizade verdadeira, companheirismo e apoio em diversos momentos.

Ao Alexandre Guilherme, minha eterna gratidão pela paciência, contribuição para realização deste trabalho, carinho, amizade e momentos de descontração.

À minha amiga-irmã Ana Lúcia pelo enorme carinho, incentivo e apoio.

Ao Yuri Brandão, por seu amor, carinho, companheirismo, paciência e por me fazer a cada dia a pessoa mais feliz.

Aos meus amigos, Amanda, Camila, Irla, Jr, Lara, Mary, Rose, Ximenes, Wal e Yuri, Fábio, por se fazerem sempre presentes e proporcionarem momentos inesquecíveis em minha vida.

Aos colegas da turma de mestrado pela amizade e companheirismo durante o decorrer do curso.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos e colaboração durante o curso de Mestrado.

Ao secretário do curso de Mestrado, Paulo Mendes, por sua dedicação e ajuda no decorrer do curso.

À Universidade Federal do Ceará, por ampliar meus conhecimentos e contribuir para a realização profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante todo o curso.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo fornecimento do suco de caju utilizado neste experimento

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.



*“Aprendi que são os pequenos acontecimentos  
diários que tornam a vida espetacular.”*

*(William Shakespeare)*

## RESUMO

Os microrganismos *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F e *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742 são bactérias ácido lácticas heterofermentativas que durante seu metabolismo produzem vários produtos de interesse como o manitol, utilizado como adoçante de elevado valor nutricional, em balas *sugar free*. A utilização de subprodutos agrícolas em processos fermentativos tem sido alvo de crescentes estudos e neste contexto, substratos de origem agropecuária tais como o suco de caju apresenta-se como alternativas interessantes para redução de custos e, portanto aumento da competitividade no mercado mundial. O caju possui pedúnculo que é desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado à amêndoa da castanha. No entanto, o pedúnculo é rico em açúcares redutores (glicose e frutose) e não requer nenhum tratamento prévio como hidrólise ou tratamento enzimático, sendo assim uma matéria-prima de baixo custo. Desta forma, este trabalho visou avaliar a atividade metabólica do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F e *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742 na fermentação do suco de caju clarificado, utilizando-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, para produção de manitol.

**Palavras-chave:** *Leuconostoc mesenteroides*, suco de caju, sulfato de amônio, manitol.

## ABSTRACT

The microorganisms *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and B-742 are heterofermentative lactic acid bacteria that produce several products of interest such as mannitol, used as a sweetener of high value nutrition in sugar free candies. The use of agricultural by-products in fermentation process has been the subject of increasing studies, and the use of agricultural substrates such as cashew apple juice, is an alternative to reduce costs, increasing competitiveness in the market. The cashew fruit has a peduncle (apple) that is wasted, because the major value of this culture is associated to the cashew nuts. However, the cashew apple is rich in sugars (glucose and fructose) and requires no pretreatment such as hydrolysis or enzyme treatment, being a raw material of low cost. This work aimed to study the metabolism of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742 in cashew clarified apple juice, using ammonium sulfate as nitrogen source in the culture medium, for the production of mannitol.

**Key- words:** *Leuconostoc mesenteroides*, cashew juice, ammonium sulfate, mannitol.

## LISTA DE TABELAS

| <b>Tabela</b> |  | <b>Página</b> |
|---------------|--|---------------|
| 1             | Composição química e físico-química do pedúnculo do caju. . . . .  | 30            |
| 2             | Meio padrão otimizado para ativação das bactérias lácticas heterofermentativas <i>L. mesenteroides</i> B-512F e <i>L. mesenteroides</i> B-742. . . . .                             | 32            |
| 3             | Composição de carboidratos presentes no meio de cultura.   | 34            |
| 4             | Planejamento experimental para otimização do meio de cultura a base de suco de caju para produção de manitol com <i>L. mesenteroides</i> B-512F e <i>L. mesenteroides</i> B-742... | 36            |
| 5             | Composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado. . . . .  | 44            |
| 6             | Planejamento experimental e resultados obtidos de biomassa para o <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F cultivado em suco de caju. . . . .                                       | 51            |
| 7             | Planejamento experimental e resultados obtidos de biomassa para o <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742 cultivado em suco de caju. . . . .  | 52            |
| 8             | Efeitos estimados para a biomassa ( <i>L. mesenteroides</i> B-512F). . . . .   | 52            |
| 9             | Efeitos estimados para a biomassa ( <i>L. mesenteroides</i> B-742). . . . .  | 53            |
| 10            | Análise de variância para a biomassa de <i>L. mesenteroides</i> B-512F. . . . .  | 54            |
| 11            | Análise de variância para a biomassa de <i>L. mesenteroides</i> B-742. . . . .   | 54            |
| 12            | Manitol produzido e frutose consumida na fermentação do suco de caju de acordo com planejamento experimental (TABELA 4) para o <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F. . . . .    | 57            |
| 13            | Manitol produzido e frutose consumida na fermentação do suco de caju de acordo com planejamento experimental (TABELA 4) para o <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742. . . . .     | 57            |
| 14            | Efeitos estimados para o manitol produzido ( <i>L. mesenteroides</i> B-512F). . . . .  | 58            |
| 15            | Efeitos estimados para o rendimento em manitol ( <i>L. mesenteroides</i> B-742). . . . .   | 58            |
| 16            | Análise de variância para o manitol produzido pelo <i>L. mesenteroides</i> B-512F. . . . .   | 59            |
| 17            | Análise de variância para o manitol produzido pelo <i>L. mesenteroides</i> B-742. . . . .  | 60            |
| 18            | Manitol produzido e frutose consumida na fermentação do suco de caju para o <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F. . . . .   | 63            |
| 19            | Manitol produzido e frutose consumida na fermentação do suco de caju para o <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742. . . . .  | 63            |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| 1             | Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas heterofermentativas. ....  | 25            |
| 2             | (a) Perfil de carboidratos e biomassa para o meio de cultura A;<br>(b) Taxas cinéticas para consumo de carboidratos e formação de biomassa e manitol para o meio de cultura A. .... | 46            |
| 3             | (a) Perfil de carboidratos e biomassa para o meio de cultura B;<br>(b) Taxas cinéticas para consumo de carboidratos e formação de biomassa e manitol para o meio de cultura B. .... | 46            |
| 4             | (a) Perfil de carboidratos e biomassa para o meio de cultura C;<br>(b) Taxas cinéticas para consumo de carboidratos e formação de biomassa e manitol para o meio de cultura C. .... | 47            |
| 5             | Comparativo do rendimento de manitol obtido para os meio de cultura A, B e C. ....  | 49            |
| 6             | Comparativo da produtividade de manitol obtida para os meio de cultura A, B e C. ....   | 49            |
| 7             | Superfície de resposta para a Biomassa ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F) na fermentação do suco de caju clarificado. ....  | 55            |
| 8             | Superfície de resposta para a Biomassa ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742) na fermentação do suco de caju clarificado. ....   | 56            |
| 9             | Superfície de resposta para manitol produzido ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F) na fermentação do suco de caju clarificado. ....   | 61            |
| 10            | Superfície de resposta para manitol produzido ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-472) na fermentação do suco de caju clarificado. ....  | 61            |

## SUMÁRIO

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | INTRODUÇÃO . . . . .   | 16 |
| 2       | REVISÃO DA LITERATURA. . . . .   | 19 |
| 2.1     | Manitol. . . . .   | 19 |
| 2.2     | Aplicações do Manitol. . . . .   | 19 |
| 2.3     | Processos de obtenção de manitol. . . . .  | 21 |
| 2.3.1   | Hidrogenação catalítica. . . . .   | 21 |
| 2.3.2   | Síntese enzimática. . . . .  | 21 |
| 2.3.3   | Produção microbiana. . . . .   | 22 |
| 2.4     | Via de fermentação das hexoses. . . . .  | 24 |
| 2.4.1   | Bactérias ácido lácticas homofermentativas. . . . .  | 24 |
| 2.4.2   | Bactérias ácido lácticas heterofermentativas . . . . .   | 24 |
| 2.5     | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742. . . . .                      | 27 |
| 2.6     | Utilização de substratos de origem agropecuária. . . . .   | 27 |
| 2.7     | Caju . . . . .   | 28 |
| 2.8     | Composição química do caju. . . . .  | 29 |
| 2.9     | Suco de caju. . . . .  | 31 |
| 3       | MATÉRIAL E MÉTODOS. . . . .  | 32 |
| 3.1     | Obtenção do microrganismo. . . . .   | 32 |
| 3.2     | Ativação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F e B-742. . . . .   | 32 |
| 3.3     | Obtenção do suco de caju. . . . .  | 33 |
| 3.4     | Caracterização físico-química do suco de caju clarificado . . . . .  | 33 |
| 3.5     | Estudo cinético da produção de manitol usando suco de caju como substrato . . . . .                            | 34 |
| 3.6     | Otimização do meio de cultura para a produção de manitol em suco de caju utilizando sulfato de amônio. . . . . | 35 |
| 3.7     | Estudo do controle de pH na produção de manitol. . . . .   | 37 |
| 3.8     | Taxas cinéticas . . . . .  | 38 |
| 3.9     | Análises químicas e físico-químicas. . . . .   | 38 |
| 3.9.1   | pH. . . . .  | 38 |
| 3.9.2   | Determinação dos açúcares redutores do suco de caju clarificado. . . . .                                       | 38 |
| 3.9.3   | Determinação de proteínas. . . . .   | 39 |
| 3.9.4   | Composição mineral do suco de caju. . . . .  | 40 |
| 3.9.5   | Determinação do crescimento microbiano. . . . .  | 41 |
| 3.9.6   | Determinação de açúcares e manitol através de cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). . . . .         | 41 |
| 3.9.6.1 | Equipamento. . . . .   | 41 |
| 3.9.6.2 | Fase móvel. . . . .  | 42 |
| 3.9.6.3 | Curva de calibração. . . . .   | 42 |
| 3.9.6.4 | Preparação das amostras. . . . .   | 42 |
| 3.9.6.5 | Método de análise. . . . .   | 43 |
| 3.10    | Delineamento experimental. . . . .   | 43 |
| 4       | RESULTADOS E DISCUSSÃO. . . . .  | 44 |
| 4.1     | Caracterização físico-química do suco de caju clarificado . . . . .  | 44 |
|         | Estudo cinético da produção de manitol usando suco de caju como  |    |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.2 | substrato . . . . .   | 45 |
|     | Otimização do meio de cultura para produção de manitol utilizando |    |
| 4.3 | sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. . . . .               | 51 |
| 4.4 | Estudo do controle de pH na produção de manitol . . . . .         | 63 |
| 5   | CONCLUSÃO . . . . .   | 65 |
| 6   | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .                              | 66 |

## 1 INTRODUÇÃO

O Manitol é um açúcar – álcool ou poliálcool de seis carbonos, mundialmente utilizado pelas indústrias de alimentos, química e farmacêutica, bem como na medicina (HELANTO *et al.*, 2005). É conhecido por apresentar efeitos benéficos à saúde, capaz de atuar como um antioxidante, ou mesmo, como um adoçante de baixo valor calórico. A adição de manitol a alimentos, ou mesmo, sua produção natural pela utilização de microrganismos de grau alimentar, pode levar à obtenção de produtos com um valor extra-nutricional (WISSELINK *et al.*, 2002; HELANTO *et al.*, 2005).

Recentemente, vários poliálcoois como xilitol, sorbitol e manitol têm sido utilizados como adoçantes alternativos por suas propriedades e funcionalidades.

Até 1920, o exsudado produzido por freixo maná (*Fraxinus ornus*) era a fonte comercial de manitol. Atualmente, sua produção industrial é realizada pelo processo de hidrogenação catalítica de uma mistura equimolar de glicose/frutose (1:1), utilizando catalisador de níquel e gás hidrogênio a alta temperatura e pressão. Nesta reação, a glicose é completamente convertida a sorbitol, enquanto que a frutose é convertida em uma mistura de manitol e sorbitol (30:70). Em seguida, o manitol é separado por cristalização, uma vez que é menos solúvel que o sorbitol. A produção mundial estimada é aproximadamente de 30,000 toneladas por ano (WEYMARN *et al.*, 2002; WISSELINK *et al.*, 2002; HELANTO *et al.*, 2005).

Outra forma de obtenção do manitol é a produção enzimática a partir da frutose com a utilização da enzima manitol desidrogenase. Entretanto, este processo pode não ser viável do ponto de vista econômico, uma vez que, a rota enzimática pode resultar em baixos rendimentos, decorrente de uma inibição pelo produto, além de necessitar de cofatores de elevado custo como o NAD(P)H, que ainda precisa ser regenerado (WISSELINK *et al.*, 2002).



A principal vantagem do desenvolvimento de um processo fermentativo para a produção de manitol com o emprego de bactérias lácticas pode ser atribuída à utilização de um microrganismo comumente utilizado para a produção de alimentos, sendo seus produtos, portanto, diretamente aplicáveis em produtos alimentícios sem restrições. Algumas bactérias lácticas são conhecidas por produzir manitol, e este processo de obtenção de manitol vai depender da rota metabólica para fermentação das hexoses a ser realizada, a qual pode seguir dois caminhos: o homofermentativo e heterofermentativo. O metabolismo homofermentativo, utiliza a via Embden Meyerhof-Parnas, ou simplesmente via glicolítica, na qual é formado principalmente o lactato. Já no metabolismo heterofermentativo, em geral, é utilizada a Via das Pentoses, na qual além do lactato, outros compostos como o acetato, e o etanol podem ser formados, permitir ainda, uma conversão exclusiva da frutose em manitol, pela enzima intracelular NADH dependente, manitol desidrogenase (WISSELINK *et al.*, 2002).

No entanto, as bactérias lácticas necessitam de minerais específicos, vitaminas do complexo B, e diversos aminoácidos para garantir seu crescimento. O extrato de levedura é uma fonte de nutrientes, comumente utilizada em laboratório para o cultivo de microrganismos. Trata-se de uma fonte muito rica de nutrientes, e segundo diversos autores, a melhor para o cultivo de bactérias lácticas (ARASARATNAM *et al.*, 1996; GÖKSUNGUR & GÜVENC, 1997, NANCIB *et al.*, 2005).

Leveduras, fungos e em especial, as bactérias ácido lácticas heterofermentativas pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*, têm sido reportados por produzirem manitol eficientemente, sem a formação de sorbitol (WEYMARN *et al.*, 2002). A enzima microbiana intracelular NADH-dependente, D-manitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.67), converte a frutose em manitol, que é excretado pela célula (WISSELINK *et al.*, 2002).

Devido a crescente demanda por produtos biotecnológicos, esforços para a diminuição do custo do processo produtivo tem sido alvo recente de estudos. A utilização de substratos de origem agropecuária tais como: amido, melação de cana, xarope de abacaxi e suco de uva tem sido estudada como uma forma de redução de custos e, portanto, aumento da competitividade no mercado mundial.

Desta forma, o uso de matérias-primas agrícolas regionais como substrato de baixo custo para o desenvolvimento de processos fermentativos é uma alternativa interessante. O caju possui pedúnculo que é desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado à amêndoa da castanha. Estima-se uma produção anual de 2 milhões de toneladas de caju. Entretanto, menos de 10% desse total é aproveitado industrialmente ou para consumo *in natura*, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento.

O suco de caju é rico em nutrientes e açúcares (principalmente glicose e frutose), e não requer nenhum tratamento prévio como hidrólise ou tratamento enzimático, sendo assim uma matéria-prima de baixo custo para uso como substrato em processos fermentativos.

Neste trabalho, a produção de manitol utilizando suco de caju como substrato foi estudada.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Manitol**

O manitol é um açúcar – álcool ou poliálcool de seis carbonos naturalmente presente em pequenas quantidades na maioria das frutas e vegetais (LEWIS *et al.*, 1967; IKAWA *et al.*, 1972), que também pode ser produzido por alguns microrganismos a partir de frutose e sacarose (YUN e SONG, 1994).

Normalmente, pode ser encontrado em plantas como abóbora, aipo, cebola, ervas e líquens (WISSELINK *et al.*, 2002). Também pode ser obtido através do exsudado da árvore Manna (*Fraxinus ornus*), o qual foi a grande fonte comercial de manitol até 1920 (SOETAERT, 1990).

É mundialmente utilizado pelas indústrias farmacêuticas, química e de alimentos, sendo nesta última empregado como adoçante alternativo e agente de textura (SAHA e NAKAMURA, 2003).

### **2.2 Aplicações do Manitol**

O manitol é conhecido por apresentar vários efeitos benéficos à saúde, desta forma sua adição a alimentos pode levar à obtenção de produtos com um valor extra-nutricional (WISSELINK *et al.*, 2002; HELANTO *et al.*, 2005). Como os demais açúcares álcoois, em virtude de sua estrutura química, são parcialmente absorvidos pelo organismo, não tendo influência sobre os níveis de insulina no sangue, desta forma, não induzem a hiperglicemia, podendo ser aplicados em alimentos destinados a diabéticos (GRIFFIN e LYNCH, 1972), além de ser não cariogênico.

É comumente aplicado na formulação de alimentos “light” e balas “sugar free”, uma vez que apresenta baixo valor calórico (1,6 Kcal. g<sup>-1</sup>), comparado aos demais açúcares, além disso, possui aproximadamente 40 a 50% do poder adoçante da sacarose (WEYMARN, 2003).

Por outro lado, em virtude da incompleta absorção do manitol pelo intestino delgado, alguns efeitos colaterais podem ser observados, como flatulência e diarreia (SCHIWECK *et al.*, 1994). Desta forma, a dose diária de manitol não deve exceder 20g (DWIVEDI, 1978).

Contudo, o manitol é considerado um aditivo alimentar (E421) seguro ou *Generally Regarded as Safe* (GRAS). Outra característica importante do manitol é seu potencial não higroscópico, reduzindo assim, a tendência de cristalização dos açúcares, razão pelo qual tem sido bastante utilizado com o objetivo de aumentar a vida de prateleira de alimentos e cosméticos (HELANTO *et al.*, 2005).

Segundo Saha e Nakamura (2003), em virtude dessas características o manitol é bastante utilizado na indústria farmacêutica na formulação de comprimidos, já que impede a absorção de água, além de não interagir com componentes ativos e apresentar um sabor doce fresco que mascara o sabor desagradável de muitas drogas. Também tem sido associado ao manitol, efeito osmoprotetor em organismos sujeitos a condição de stress, como redução da atividade de água (Aw), melhorando a viabilidade de células liofilizadas (WISSELINK *et al.*, 2002), e ação antioxidante, evitando danos à molécula de DNA, e conseqüentemente, protegendo alguns sistemas do organismo humano (LI *et al.*, 1996; WISSELINK *et al.*, 2002).

## **2.3 Processos de obtenção de manitol**

### **2.3.1 Hidrogenação catalítica**

De acordo com Soetaert (1990), até 1920, o exsudado produzido pela freixo maná (*Fraxinus ornus*) era a única fonte comercial de manitol.

Atualmente, sua produção industrial é realizada pelo processo de hidrogenação catalítica através de uma mistura equimolar de glicose e frutose (1:1), em solução aquosa a alta temperatura (120 – 160 °C) e pressão, utilizando catalisador de níquel e gás hidrogênio (SAHA, 2006; WISSELINK *et al.*, 2002). Nesta reação, a glicose é completamente convertida a sorbitol, enquanto que a frutose é convertida em uma mistura de aproximadamente 30% de manitol e 70% de sorbitol. Em seguida, o manitol é separado por cristalização, uma vez que é menos solúvel que o sorbitol. Desta forma, a produção de manitol é acompanhada pela formação de seu isômero sorbitol, resultando em um processo ineficiente.

O processo de hidrogenação catalítica apresenta como desvantagens o uso de substratos de elevada pureza, como o gás hidrogênio, baixo rendimento em manitol e necessidade de purificação do produto formado, com conseqüente elevação dos custos do processo (WEYMARN, *et al.*, 2003).

### **2.3.2 Síntese enzimática**

Outra forma de obtenção do manitol é a produção enzimática a partir da frutose, com a utilização da enzima NAD(P)H dependente, manitol dehidrogenase. Entretanto, este processo pode não ser viável do ponto de vista econômico, uma vez que, a rota enzimática pode resultar em baixos rendimentos, decorrente de uma inibição pelo produto, além de necessitar de cofatores de elevado custo como o NAD(P)H, que ainda precisa ser regenerado (WISSELINK *et al.*, 2002).

### 2.3.3 Produção microbiana

Estudos têm sido desenvolvidos a fim de apresentar alternativas para obtenção de manitol. Dentre eles, destacam-se a síntese microbiana de manitol, na qual alguns microrganismos, como leveduras, fungos filamentosos e bactérias lácticas (LAB), em especial, têm se mostrado eficazes para produzir o manitol sem co-formação de sorbitol (ITOH *et al.*, 1992).

Com leveduras e fungos filamentosos, têm sido relatados moderados rendimentos de manitol a partir de matérias-primas açucaradas (glucose, glicerol, ou sacarose). Porém, as taxas de produção são reduzidas. A produtividade volumétrica alcançados com fungos filamentosos e leveduras em cultivos em batelada geralmente não excede 2 g de manitol. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>. O cultivo prolongado com estes organismos também aumenta o risco de contaminação (WEYMARN *et al.*, 2003).

A síntese bacteriana, no entanto, depende da via de fermentação das hexoses utilizada pelo microrganismo, sendo classificada em dois tipos: fermentação homolática, na qual é formado principalmente lactato, sendo a formação de manitol, decorrente de um desvio da via de produção de lactato; e a fermentação heterolática, com redução direta da frutose a manitol, pela enzima NAD(P)H dependente, manitol dehidrogenase (WISSELINK *et al.*, 2002).

Em geral, as melhores linhagens de bactérias ácido lácticas produtoras de manitol são as que apresentam metabolismo heterofermentativo. Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*, têm sido reportadas por produzirem eficazmente manitol a partir de frutose (YUN *et al.*, 1996; SAHA, 2006).

Peterson e Fred em 1920 reportaram a formação de manitol por *Lactobacillus pentoaceticus*. Na presença de sacarose e frutose algumas linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* produzem altos níveis de manitol. Altas concentrações de manitol (~150g/L), próximas ao limite de solubilidade do produto (180 g/L) foram reportadas indicando que este produto não tem efeito tóxico sobre este microrganismo.

Segundo Grobber *et al* (2001), o *Leuconostoc (pseudo) mesenteroides* produz elevados níveis de manitol a partir de frutose e sacarose, assim como *Lactobacillus sp* e *Leuconostoc sp.*, produzem manitol de frutose e sacarose (YUN e KIN, 1998).

*Lactobacillus intermedius* NRRL em uma mistura de glicose e frutose (1:2), converteram a glicose em ácido lático e ácido acético, e a frutose a manitol (SAHA e RACINE, 2007).

A produção de manitol por fermentação apresenta diversas vantagens, comparada com a síntese química, uma vez que permite uma completa conversão da frutose a manitol; não há formação de produtos como o sorbitol que dificultam a sua separação; e é realizada em moderadas condições de operação e não requer substratos altamente purificados (WISSELINK *et al.*, 2002).

Além disso, a utilização de bactérias ácido lácticas e outros microrganismos de grau alimentar promovem diversas vantagens, uma vez que por serem microrganismos considerados seguros, seus produtos podem ser diretamente aplicados em alimentos, sem restrições, além de que alguns desses microrganismos são conhecidos por exercerem efeitos benéficos ao trato gastrointestinal (WISSELINK *et al.*, 2002).

## 2.4 Via de fermentação das hexoses

Conforme mencionado anteriormente, as bactérias ácido lácticas são classificadas em dois grupos, conforme a via de fermentação das hexoses, em homofermentativas e heterofermentativas.

### 2.4.1 Bactérias ácido lácticas homofermentativas

As bactérias ácido lácticas homofermentativas fermentam as hexoses como a glicose, pela via glicolítica, também conhecida como Embden-Meyerhof-Parnas, caracterizada pela formação de frutose 1,6-difosfato (FDP), a qual é quebrada por uma aldolase em dihidroxiacetone-fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-Fosfato (GAP). Nesta via, o piruvato é reduzido a ácido láctico por uma enzima  $\text{NAD}^+$  - dependente, a lactato desidrogenase, com a reoxidação do NADH formado durante as etapas da glicólise. Desvios nessa rota metabólica podem levar à formação de outros compostos como acetato, etanol, acetona, diacetil e 2,3 – butanodiol. Na fermentação homoláctica, para cada 1 mol de glicose metabolizado, são gerados 2 mol de ácido láctico e 2 mol de ATP.

### 2.4.2 Bactérias ácido lácticas heterofermentativas

As bactérias ácido lácticas heterofermentativas, pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*, por sua vez, utilizam a via fosfatoaldolase ou via das pentoses, para fermentação das hexoses (WISSELINK *et al.*, 2002). A ausência da enzima frutose 1,6-difosfato aldolase, leva à formação da xilulose 5 – fosfato. Esta via é caracterizada pela quebra dessa pentose por uma fosfatoaldolase em gliceraldeído – 3 – fosfato e acetilfosfato (WEYMARN, 2002). Desta forma, 1 mol de glicose é convertido em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, e há formação de 1 mol de ATP (COGAN e JORDAN, 1994). Sob condições anaeróbicas, compostos como piruvato, glicerol e frutose são utilizados como aceptores alternativos de elétrons.



Ao atuar como acceptor de elétrons, a frutose é reduzida a manitol, e esta reação é catalisada pela enzima intracelular NAD(P)H dependente, manitol desidrogenase. Esta reação é a grande característica do processo de produção microbiana de manitol, uma vez que esta enzima reduz a frutose exclusivamente a manitol com elevada atividade (WISSELINK *et al.*, 2002). Esta reação causa uma alteração no equilíbrio redox das células, favorecendo a formação de acetato ao invés de etanol, acompanhado do ganho de 1 mol de ATP (FOUCAUD e HEMME, 2004), e taxas de crescimento mais elevadas (COGAN e JORDAN, 1994; DOLS, *et al.*, 1997), conforme descrito na FIGURA 1.

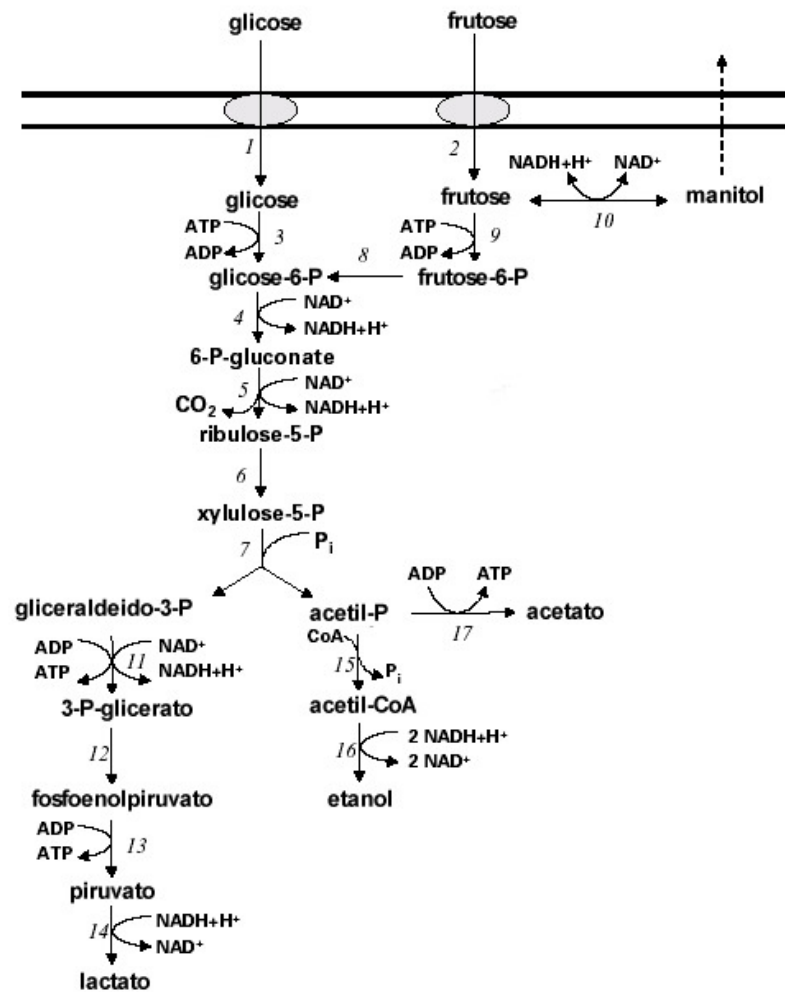
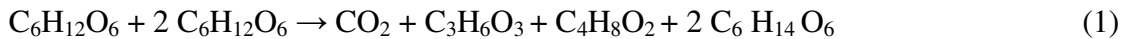


FIGURA 1. Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas heterofermentativas. (1) e (2) glicose e frutose permeases, (3) glucoquinase, (4) glicose-6-fosfato desidrogenase, (5) 6-fosfogluconato desidrogenase, (6) epimerase, (7) fosfoacetilase, (8) glicose fosfato isomerase, (9) frutoquinase, (10) manitol desidrogenase, (11) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e fosfoglicerato quinase, (12) fosfogliceromutase enolase, (13) piruvato quinase, (14) lactato desidrogenase, (15) fosfato acetil transferase, acetaldeído desidrogenase e (17) álcool desidrogenase. (WISSELINK, *et al.*, 2002)

Erten (1998) observou a produção de manitol pelo *Leuconostoc mesenteroides* em uma mistura de glicose e frutose como fontes de carboidratos. Esta conversão pode ser esquematizada pela EQUAÇÃO 1:



Nas condições descritas pela EQUAÇÃO 1, um máximo rendimento de 2 mol de ATP por mol de glicose fermentada pode ser observado, acompanhado da completa redução da frutose a manitol. No entanto, se apenas frutose é utilizada como fonte de carboidrato durante a fermentação, esta atuará tanto como substrato para via fosfatoaldolase, como acceptor de elétrons (RITCHER *et al.*, 2003 a,b; ZAUNMÜLLER *et al.*, 2006). Nesta situação, de cada 3 mol de frutose, 1 mol é fermentado e 2 mol convertidos a manitol. Assim, a taxa de conversão de frutose a manitol, não ultrapassa 67%. E o rendimento em ATP é de 2 mol (WISSELINK *et al.*, 2002).

Segundo Dols *et al* (1997), a fração de frutose convertida a manitol varia em relação à estratégia de aeração sendo mais elevada (cerca de 65%) em condições anaeróbias, embora tenha sido observada a produção de pequenas quantidades de manitol em culturas aeradas. Já a frutose metabolizada através do da via fosfatoaldolase é convertida a quantidades equimolares de lactato, acetato e CO<sub>2</sub>.

## 2.5 *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e *Leuconostoc mesenteroides* B-742

Os microorganismos *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e *Leuconostoc mesenteroides* B-742 são bactérias ácido lácticas heterofermentativas não esporulantes, aeróbias facultativas, mesófilas (FOUCAUD e HEMME, 2004), com crescimento ótimo entre 25 – 30 °C e pH ótimo na faixa de 6,0 a 6,9 (SANTOS, 2000). Segundo GAO (2006), são bactérias nutricionalmente exigentes, requerendo minerais ( $Mg^{+2}$  e  $Mn^{+2}$ ), vitaminas, em especial do complexo B e aminoácidos para seu ótimo crescimento.

São microrganismos não patogênicos e seguros do ponto de vista alimentar, capazes de produzir ácido láctico a partir da glicose e converter eficazmente manitol a partir da redução da frutose, sem a formação de sorbitol. De acordo com Weymarn (2002), o *Leuconostoc mesenteroides* e o *Leuconostoc pseudomesenteroides* crescem significativamente rápido e produzem manitol com elevada produtividade volumétrica.

## 2.6 Utilização de substratos de origem agropecuária

Em virtude da crescente demanda, esforços para a diminuição do custo do processo produtivo tem sido alvo recente de estudos. A utilização de substratos de origem agropecuária tais como: amido, melão de cana, xarope de abacaxi e suco de uva tem sido estudada como uma forma de redução de custos e, portanto, aumento da competitividade no mercado mundial.

Neste contexto, o uso de matérias-primas agrícolas regionais como substrato de baixo custo para o desenvolvimento de processos fermentativos é uma alternativa interessante. O caju possui pedúnculo que é desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado à amêndoa da castanha. O processamento do pedúnculo possui segmentos em vários setores industriais, como bebidas, doces, farinhas, condimentos e ração animal. O produto de maior expressão econômica é a amêndoa, sendo tipicamente um produto de exportação, enquanto os produtos obtidos a partir do processamento do pedúnculo destinam-se basicamente ao mercado interno (LEITE, 1994).

## 2.7 Caju

O cajueiro é uma planta rústica, originária do Brasil, sendo típica de regiões de clima tropical. Na Amazônia tropical, as árvores apresentam porte bastante elevado; nos Estados do Nordeste brasileiro, a principal espécie de ocorrência é o *Anacardium occidentale* L., cujas árvores apresentam pequeno e médio porte, sendo esta a única espécie do gênero que é cultivada com finalidade comercial, enquanto que as demais espécies são exploradas apenas por extrativismo (SANCHO, 2006; RABELO, 2008).

A agroindústria do caju no Brasil é responsável por uma área plantada em torno de um milhão de hectares. Na região Nordeste, que concentra 99% da área plantada, representa uma de suas principais atividades agroindustriais, em particular nos Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, nos quais é responsável pela geração de emprego, renda e impostos, em decorrência dos produtos industrializados oriundos do seu fruto e pseudofruto (MAIA, 2001; PETINARI e TARSITANO, 2002).

O caju compõe-se da castanha – o verdadeiro fruto – e de um pedúnculo hipertrofiado. A castanha, verdadeiro fruto do cajueiro, é um aquênio reniforme (3g a 32g), com tegumento liso, coriáceo, cinzento ou verde acinzentado; o mesocarpo é espesso, alveolado, cheio de um líquido viscoso, vermelho, acre, cáustico e inflamável, comumente chamado LCC (líquido da casca da castanha). A ela está associado grande valor comercial tanto no Brasil como no exterior, constitui-se no principal produto de utilização do cajueiro (MENEZES e ALVES, 1995).

O pedúnculo do caju que apresenta cerca de 10 vezes o peso da castanha representa uma quantidade enorme de matéria-prima perdida anualmente, correspondendo a valores que chegam a quase um milhão de toneladas anuais no Estado do Ceará, que detém 54,4 % de quase um milhão de hectares plantados no país com esse tipo de lavoura (SANCHO, 2006; RABELO, 2008).

Estima-se que o aproveitamento do pedúnculo seja inferior a 6% da produção nacional. Este resultado é consequência da alta perecibilidade do pedúnculo do caju, associada ao curto período da safra e a inexistência de métodos econômicos de preservação da matéria-prima (COSTA, 1999; RABELO, 2008).

O pedúnculo pode ser consumido *in natura* ou mesmo industrializado sob a forma de sucos, sorvetes, doces diversos, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados, vinho e aguardente. O derivado do pedúnculo de maior importância econômica é o suco industrializado com grande aceitação no mercado nacional (GALVÃO, 2006). A utilização dessas tecnologias de industrialização contribui para o aproveitamento e geração de renda nas regiões produtoras (AGUIAR *et al.*, 2000; ASSUNÇÃO e MERCADANTE, 2000a; BORGES *et al.*, 2000; PETINARI e TARSITANO, 2002; LIMA *et al.*, 2007).

Segundo Costa (2003), 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 cajueiro nativos do Brasil – cerca de 364 mil hectares.

## **2.8 Composição química do caju**

De acordo com Souza *et al.* (2002), o pedúnculo de caju apresenta uma grande variabilidade com relação às suas características químicas e físico-químicas, influenciadas pelo tipo de solo, o clima, o estágio de maturação e as condições de cultivo.

Em sua composição química, observa-se a presença de vitaminas, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos que o tornam um alimento importante do ponto de vista nutricional, mas que por outro, são responsáveis por sua alta perecibilidade, exigindo

cuidados especiais quanto a sua estocagem, transporte, limpeza e processamento (AZOUBEL *et al.*, 2005; GALVÃO, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

Silva e Naves (2001) salientam que o caju é considerado uma ótima fonte de vitamina C e boa fonte de vitaminas do complexo B, como riboflavina e tiamina. A TABELA 1 apresenta respectivamente as características químicas e físico-químicas do pedúnculo de caju.

TABELA 1 - Composição química e físico-química do pedúnculo do caju

| <b>Determinações</b>                               | <b>Valores médios</b> |
|--|-----------------------|
| Açúcares redutores (%)                             | 8,00                  |
| Vitamina C (mg/100mL)                              | 261,00                |
| Acidez Total (em ácido cítrico %)                  | 0,35                  |
| Tanino (%)   | 0,35                  |
| Sólidos solúveis (°Brix)                           | 10,70                 |
| Cálcio (mg/100g)                                   | 14,70                 |
| Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (mg/100g) | 32,55                 |
| Umidade (%)  | 86,33                 |
| pH   | 3,90                  |

Fonte: SOARES (1986)

O alto valor nutritivo do pedúnculo revela-se sob a forma de vitaminas e sais minerais, nele encontrando-se a vitamina C em níveis quase cinco vezes maior que na laranja, tendo ainda, entre outros, a presença de cálcio, ferro e fósforo. É bastante apreciado nos mercados interno e externo. 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).

## 2.9 Suco de caju

Dentre os diversos produtos que podem ser obtidos das frutas, destacam-se os sucos, considerados produtos de larga aceitação pelos consumidores em todos os continentes, sendo apreciados não só pelo seu sabor, mas, também, por serem fontes de nutrientes, como, vitaminas, minerais, carboidratos e carotenóides, importantes na manutenção de uma vida saudável (PINHEIRO *et al*, 2006).

No Brasil, em 2003, foram consumidos aproximadamente 2,2 bilhões de litros de sucos, nas mais diferentes formas. Destes, 579 mil litros são de sucos integrais, com destaque para caju (51%) e maracujá (24%) (COSTA, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2006).

De acordo com a legislação brasileira o suco de caju clarificado é definido como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale*, L.), através de processo tecnológico adequado. O suco deve apresentar características de odor e sabor próprios de cada fruta e a coloração variando da cor branca à amarelada. (BRASIL, 2000).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do microrganismo

Os microrganismos *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e B-742 liofilizados foram fornecidos pelo Departamento Estadual de Agricultura dos EUA (*United State Department of Agricultural, Peoria, Illinois, NRRL Culture Collection*). No Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC/DETAL/UFC), são mantidas culturas estoque congeladas de cada cepa.

#### 3.2 Ativação do *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e B-742

Os microrganismos foram ativados em meio padrão otimizado, contendo sacarose como fonte de carbono, conforme Guimarães *et al.* (1999), o qual está descrito na TABELA 2.

TABELA 2 - Meio padrão otimizado para ativação das bactérias heterofermentativas *L.mesenteroides* B-512F e *L.mesenteroides* B-742

| Reagente                     | Concentração(g/L) |
|------------------------------|-------------------|
| Sacarose                     | 50,0              |
| Extrato de levedura          | 10,0              |
| 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              |
| pH 6,5 121°C/15min           |                   |

Fonte: GUIMARÃES *et al.* (1999).

O meio foi preparado pela diluição de soluções salinas mais concentradas (soluções estoque) de forma a atingirem as concentrações estabelecidas na TABELA 2, e em seguida, dividido em Erlenmeyers de 100 mL. Uma solução concentrada de fosfato de potássio dibásico (200 g/L) foi preparada separadamente, em virtude de ensaios anteriores demonstrarem que quando o sal é autoclavado na presença dos demais componentes do meio,

ocorre precipitação no meio. (RABELO, 2008). O pH do meio e da solução de fosfato de potássio dibásico foram ajustados para 6,5 (pH ótimo de crescimento dos microrganismos), com  $H_3PO_4$ , e ambos foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos, sendo posteriormente resfriados à temperatura ambiente. Uma alíquota de 10 mL de solução fosfato de potássio dibásico foi adicionada ao meio no momento da inoculação.

O processo foi conduzido inoculando-se um tubo de cultura estoque, no meio já contendo fosfato. A ativação foi conduzida estaticamente por 12 h, à temperatura ambiente (30°C) e a biomassa obtida foi utilizada como inóculo nos ensaios fermentativos a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura.

### **3.3 Obtenção do suco de caju**

O suco de caju clarificado utilizado foi obtido junto à Embrapa Agroindústria Tropical, oriundo da prensagem mecânica do pedúnculo do caju, que em seguida, foi clarificado, pela adição de gelatina, para remoção de taninos de sólidos suspensos (ABREU, 2006).

Por se tratar de uma matéria-prima para processos fermentativos, não foram adicionados aditivos ao suco de caju e este foi armazenado congelado (-18 °C).

### **3.4 Caracterização físico-química do suco de caju clarificado**

Uma caracterização físico-química do suco de caju foi realizada sendo avaliados o pH (potenciometria direta), os teores de açúcares redutores totais (glicose e frutose) pelo método de DNS (MILLER, 1959); o nitrogênio protéico determinado segundo o método (BRADFORD, 1976) e a composição mineral determinada por absorção atômica (GUILHERME *et al.*, 2008). A metodologia das análises é descrita no item 3.9.

### 3.5 Estudo cinético da produção de manitol usando suco de caju como substrato

Uma fermentação com controle de pH foi realizada para as melhores condições experimentais (25 g/L de açúcares redutores de suco de caju e 25 g/L de sacarose), conforme descrito por Honorato *et al* (2007). Suco de caju diluído foi utilizado como fonte de açúcares redutores (frutose e glicose). Duas outras fermentações foram conduzidas, sem adição de sacarose. A composição de carboidratos do meio de cultura é demonstrada na TABELA 3.

TABELA 3 - Composição de carboidratos presentes no meio de cultura

|                   | <b>Frutose<br/>(g/L)</b> | <b>Glicose<br/>(g/L)</b> | <b>Sacarose<br/>(g/L)</b> |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Meio de Cultura A | 14,09 ± 0,34             | 10,84 ± 0,30             | 0                         |
| Meio de Cultura B | 28,18 ± 0,68             | 21,68 ± 0,60             | 0                         |
| Meio de Cultura C | 14,04 ± 0,35             | 10,53 ± 0,25             | 25,05 ± 1,15              |

Extrato de levedura e fosfato de potássio (20 g/L de cada) foram adicionados para melhorar o crescimento microbiano (CHAGAS *et al*, 2007; RODRIGUES *et al*, 2003).

Inicialmente o pH foi ajustado para 6,5 (ótimo para o crescimento do *L. mesenteroides* B-512F) e o meio de cultura foi esterilizado a 121 °C por 15 min. Estudos anteriores demonstraram ser desnecessária a adição de minerais ao suco de caju (CHAGAS *et al*, 2007; HONORATO *et al*, 2007).

A fermentação foi conduzida em fermentador TECNAL, modelo TECBIO com capacidade para 1L a 30°C sob agitação de 150 rpm e controle do pH em 6,5 ( $\pm$  0,1). O sistema foi alimentado com uma solução de NaOH (120 g/L) para controle do pH durante as 8 h iniciais da fermentação. Após este período, a alimentação foi interrompida. A fermentação foi interrompida após o consumo total dos açúcares. Biomassa e a quantidade de açúcares foram monitoradas durante o processo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **3.6 Otimização do meio de cultura para a produção de manitol em suco de caju utilizando sulfato de amônio**

Para o estudo da produção de manitol a partir da fermentação do suco de caju clarificado pelos microrganismos *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e *Leuconostoc mesenteroides* B-742, inicialmente, foi realizada a otimização do meio de cultura, através de um estudo de crescimento dos microrganismos no suco de caju, associado à utilização de sulfato de amônio em substituição à fonte de nitrogênio padrão (extrato de levedura). Para isto, foi realizado um planejamento experimental  $2^2$  central composto (RODRIGUES e IEMMA, 2005) com três pontos centrais, onde foram realizados 11 ensaios no qual variaram-se as concentrações de açúcares redutores (25 a 50 g/L) e de sulfato de amônio (0 a 12 g/L). A quantidade de açúcares redutores foi estabelecida (TABELA 4) baseando-se na quantidade de açúcares redutores presentes no suco, previamente caracterizado, conforme descrito no item 3.4.

TABELA 4 - Planejamento experimental para otimização do meio de cultura a base de suco de caju para produção de manitol com *L. mesenteroides* B-512F e *L. mesenteroides* B-742

| Ensaio | Açúcares redutores (g/L) | Sulfato de amônio (g/L) |
|--------|--------------------------|-------------------------|
| 1      | 25,0                     | 0,0                     |
| 2      | 25,0                     | 12,0                    |
| 3      | 50,0                     | 0,0                     |
| 4      | 50,0                     | 12,0                    |
| 5      | 25,0                     | 6,0                     |
| 6      | 50,0                     | 6,0                     |
| 7      | 37,5                     | 0,0                     |
| 8      | 37,5                     | 12,0                    |
| 9      | 37,5                     | 6,0                     |
| 10     | 37,5                     | 6,0                     |
| 11     | 37,5                     | 6,0                     |

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6.5 (pH ótimo de crescimento do *L. mesenteroides* B 512F e B-742) e os mesmos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os microrganismos ativados foram inoculados a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura. Os ensaios foram conduzidos em *shaker* orbital (TECNAL TE-420) a 30°C e 150 rpm em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura e 10 mL de tampão fosfato de potássio. A fermentação foi conduzida por 24 horas, e ao final da mesma, foram determinados o pH e o crescimento microbiano. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação em centrífuga de marca Sigma®, modelo 6-15 a 7500 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da quantidade de açúcares residuais e manitol formado. O manitol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme metodologia descrita no item 3.9.6. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.7 Estudo do controle do pH na produção de manitol

Otimizada a composição do meio de cultura (37,5 g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de sulfato de amônio), realizou-se uma fermentação com controle de pH para produção de manitol. Suco de caju diluído foi utilizado como fonte de açúcares redutores (frutose e glicose).

Fosfato de potássio dibásico (20 g/L) foi adicionado ao meio para melhorar o crescimento microbiano. Inicialmente, o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5, que é o pH ótimo de crescimento, e o microrganismo ativado no meio sintético foi inoculado a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura. A fermentação foi conduzida em um fermentador TECNAL, modelo TECBIO (1L) a 30°C com agitação de 150 rpm.

Para cada microrganismo, foram realizadas duas fermentações. Na primeira, houve o controle contínuo do pH em 6,5. Na segunda, inicialmente, não houve controle do pH, até que este atingisse o valor 5,0, quando iniciou-se o controle do pH de forma que este não atingisse valores inferiores a 5,0 ao longo do processo, uma vez que nesse valor as células do microrganismos perdem sua viabilidade. Em ambas as fermentações, o controle do pH foi realizado através de alimentação do sistema com NaOH 3 N.

A fermentação foi conduzida por 30 h para que houvesse completo consumo dos açúcares presentes, determinado por DNS (MILLER, 1959) e o crescimento microbiano foi monitorado em intervalos de tempo regulares. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação em centrífuga de marca Sigma®, modelo 6-15 a 7500 x g por 10 minutos, e o caldo bruto utilizado para determinação da quantidade de manitol formado, conforme metodologia descrita no item 3.9.6. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **3.8 Taxas cinéticas**

Taxas específicas e a taxa de conversão  $Y_{X/S}$  (g de peso seco celular / g de substrato) foram calculados segundo equação padrão usada em processo batelada. A produtividade de manitol foi calculada dividindo-se a concentração de manitol pelo tempo de fermentação. O software Microcal Origin versão 6.0 foi utilizado para análise dos dados.

### **3.9 Análises químicas e físico-químicas**

#### **3.9.1 pH**

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

#### **3.9.2 Determinação dos açúcares redutores do suco de caju clarificado**

O método do DNS (MILLER, 1959), trata-se de um método colorimétrico para quantificação de açúcares redutores que envolve a reação da amostra com reagente de DNS (ácido dinitrosalicílico) quando submetido à temperatura de 100 °C por 5 minutos (RODRIGUES, 2003). Para a determinação das concentrações de açúcares foi construída uma curva padrão de calibração através de soluções padrão de glicose em concentrações conhecidas (0,2 a 2,0 g/L). Esta curva de calibração caracteriza-se por ser uma reta passando pela origem dos eixos, cuja equação é determinada por regressão linear.

Para obtenção da curva de calibração foram adicionados 125µL de cada solução padrão em um tubo de ensaio contendo 125µL da solução de DNS, e a mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos, sendo posteriormente, resfriada em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados à mistura, 2,250 µL de água destilada e realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP2000UV.

### 3.9.3 Determinação de proteínas

Para determinação de proteína total foi utilizado o método de Bradford (1976), que consiste na reação da proteína com o corante Coomassie Brilliant Blue G250. Para isso foi preparada uma solução contendo 0,06 % de Coomassie Brilliant Blue G250 em 1,5 % HCl (p/v), a qual foi posteriormente filtrada em papel de filtro Whatman n° 1. A partir dessa solução foi preparada uma curva padrão com albumina bovina (BSA) em concentrações conhecidas (faixa de 10 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ). Foram adicionados 50 $\mu\text{L}$  de cada solução estoque, 700 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e 750  $\mu\text{l}$  do reagente Coomassie a tubos de ensaio, os quais foram agitados imediatamente após a adição dos reagentes. Após 5 minutos, a leitura da absorbância a 595 e 465 nm contra a água foi realizada em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP2000UV. A razão das absorbâncias (595 nm/465 nm) foi *plotada* em função da massa de BSA e a equação da reta foi obtida por regressão linear dos pontos.

Para os ensaios foi realizado o mesmo procedimento utilizado para a construção da curva padrão e a partir da média das razões das absorbâncias (595 nm/465 nm) foi calculada a massa de proteína através da curva padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.



### 3.9.4 Composição mineral do suco e xarope de caju

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 desses minerais as análises foram realizadas em triplicata, inicialmente submetendo as amostras a um processo de digestão durante 24 horas com mistura ácida nitro-perclórica na proporção de 3:1 (600 mL de HNO<sub>3</sub> 65% p.a e 200 mL de HClO<sub>4</sub> 72%). A quantificação de sódio e potássio foi realizada por fotometria de emissão de chamas em um equipamento DIGIMED modelo DM-61, e os demais minerais por espectrofotometria de absorção atômica em equipamento Perkin-Elmer, modelo A-Analyst 300 (MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA, 1997).

Para determinação da composição mineral, o xarope foi diluído na proporção de (1:4) com água deionizada, sendo usados 5 mL destas soluções para as a mineralização das amostras. A mineralização foi realizada utilizando-se uma solução de ácidos HNO<sub>3</sub>: HClO<sub>4</sub> (3:1 v/v), no bloco digestor (Tecnal model TE007D) à 200° C até o volume de 1,5 mL em 3 a 4 horas. Este volume foi aferido para 50 mL com água deionizada em balão volumétrico. Um branco foi realizado com água deionizada em lugar das amostras. Padrões da Carlo Erba (Carlo Erba Reagent) foram utilizados para quantificar os minerais. Os minerais ferro, cálcio, manganês, magnésio, zinco e cobre foram quantificados por espectrofotômetro de absorção atômica em equipamento Perkin-Elmer, modelo A-Analyst 300. Ferro, cobre e zinco foram diretamente determinados a partir das diluições descritas acima. Cálcio e magnésio foram previamente diluídos em água deionizada seguido por uma segunda diluição com solução de lantânio. Potássio e sódio foram determinados por fotometria de e missão de chamas em um equipamento DIGIMED modelo DM-61 (MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA, 1997).

### **3.9.5 Determinação do crescimento microbiano**

O crescimento microbiano foi determinado por densidade ótica no comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP200UV. Nesta análise, diluiu-se uma alíquota da suspensão contendo as células em água destilada, realizando a leitura da absorbância contra um branco com água. A concentração de biomassa foi calculada através de uma curva de calibração construída com a determinação do peso seco das células seguido de diluição (RODRIGUES, 2003).

### **3.9.6 Determinação de açúcares e manitol através de cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A cromatografia é uma técnica extremamente versátil, utilizada para a separação dos componentes de uma mistura, que consiste na distribuição dos componentes da mistura entre uma fase estacionária e uma fase móvel. A separação é resultante das diferenças de velocidade entre os componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações destes componentes, com a fase estacionária (SANCHO, 2006).

#### **3.9.6.1 Equipamento**

Neste trabalho, utilizou-se um cromatógrafo líquido da marca *Varian*, composto por duas bombas de alta pressão *Pro Star 210*, um detector de índice de refração (IR) *Pro Star 355 Varian*, detector UV-Vis *Pro Star* de duplo canal modelo 342, um injetor *Rheodyne* com alça de amostragem de 20 µL, gerenciado pelo *software Star Chromatography WS* versão 6.0 e forno para termostatização da coluna.

Os açúcares residuais e o manitol foram analisados utilizando uma coluna para separação de açúcares *Shodex Sugar SC 1011* (8,0 mm x 300 mm), conectada a uma pré-coluna *Shodex Sugar*, a 80 °C, usando água deionizada como fase móvel.

### **3.9.6.2 Fase móvel**

No desenvolvimento analítico, foram utilizados como fase móvel, água purificada pelo sistema *Milli-Q* (MILLIPORE) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01M. Ambos, filtrados a vácuo, em membrana de ester de celulose com poros de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (MILLIPORE) e desgaseificados em ultra-som (MARCONI), por 15 minutos.

### **3.9.6.3 Curva de calibração**

Para a elaboração da curva de calibração, foram utilizadas soluções padrão compostas por misturas de padrões puros de glicose, frutose, sacarose e manitol, em concentrações conhecidas (faixa de 0,6 a 4,0 g/L). As soluções foram preparadas com água deionizada, e posteriormente filtradas em membrana de acetato de celulose (Whatman), com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm, e acondicionadas em frascos *ependorfs*.

### **3.9.6.4 Preparação das amostras**

Inicialmente, as amostras foram diluídas com água deionizada para que as concentrações dos analitos de interesse estivessem dentro da faixa de linearidade da curva de calibração. Em virtude da composição do suco de caju, fez-se necessário, submetê-las a um processo de extração em fase sólida, usando cartucho C<sub>18</sub> (*Bond Elut C<sub>18</sub>*), a fim de promover a retirada das substâncias coloridas que, podem interferir na determinação do analito de interesse. A extração foi realizada a uma velocidade média de fluxo correspondente a uma gota a cada três segundos. (SANCHO, 2006).

Posteriormente, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose (Whatman) com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45  $\mu\text{m}$ , acoplada a uma seringa Hamilton, e acondicionadas em frascos *eppendorfs*.

### **3.9.6.5 Método de análise**

Na metodologia utilizada para elaboração da curva de calibração e análise das amostras empregou-se uma vazão de fase móvel de 0,6 mL/ min, com a temperatura do detector em 35°C.

A identificação e quantificação dos açúcares e do manitol foi realizada por comparação entre os tempos de retenção obtidos com padrões previamente injetados.

### **3.10 Delineamento experimental**

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 95% de confiança, utilizando o programa estatístico Statistica (Statsoft) versão 7.0. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização físico-química do suco de caju clarificado

Na TABELA 5 são apresentados os resultados referentes à determinação da composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado.

TABELA 5 - Composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado.

| <b>Macronutrientes</b> |                                | <b>Micronutrientes</b> |                                 |
|------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| <b>Componentes</b>     | <b>Concentração (mg/L)</b>     | <b>Componentes</b>     | <b>Concentração (mg/L)</b>      |
| Fósforo                | 1,21 ± 0,01                    | Cobre                  | < DL*                           |
| Potássio               | 13,13 ± 0,70                   | Ferro                  | 6,97 x 10 <sup>-3</sup> ± 2,68  |
| Cálcio                 | < DL*                          | Zinco                  | 11,20 x 10 <sup>-3</sup> ± 4,31 |
| Magnésio               | 1,17 ± 0,07                    | Manganês               | 6,40 x 10 <sup>-3</sup> ± 0,35  |
| Sódio                  | 0,09 ± 0,00                    |                        |                                 |
| Enxofre                | 0,81 ± 0,02                    |                        |                                 |
| Açúcar redutor         | 65,60 ± 6,14                   |                        |                                 |
| Proteínas              | 3,54 x 10 <sup>-4</sup> ± 0,00 |                        |                                 |

DL\* - Limite de detecção

Conforme a TABELA 5, verificamos que o suco de caju apresenta diversos minerais em sua composição, dos quais se destacam o potássio, zinco, manganês e ferro. O suco também apresenta uma considerável quantidade de açúcares redutores e discreta presença de proteínas, sendo desta forma, necessária a sua complementação com uma fonte de nitrogênio. (RABELO, 2008).

## 4.2 Estudo cinético da produção de manitol usando suco de caju como substrato

O suco de caju clarificado utilizado nesse estudo tinha 100,23 g/L de açúcares redutores (44 g/L de glicose e 56 g/L de frutose) e 2,25 g/L de nitrogênio total.

As FIGURAS 2a, 3a e 4a apresentam o perfil de carboidratos e biomassa obtida nos três meios de cultura estudados. Nos meios de cultura formulados sem adição de sacarose (FIG. 2a e 3a), frutose e glicose foram consumidas simultaneamente, e a formação de manitol foi associada ao crescimento microbiano. Nesses meios, após 12 h de fermentação, não foi observada a presença de resíduos de carboidratos. Comportamento similar foi reportado por Grobber *et al* (2001), para o *Leuconostoc pseudomesenteroides* cultivado em uma mistura de glicose e frutose. No meio adicionado de sacarose (FIG. 4a), esta foi consumida rapidamente nas primeiras 10 h de fermentação, com posterior consumo da glicose e frutose presentes. A frutose foi consumida mais rapidamente que a glicose, produzindo manitol.

Não foi observada fase LAG em nenhum dos meios estudados, caracterizando uma rápida adaptação do microrganismo ao meio de cultura constituído de suco de caju.

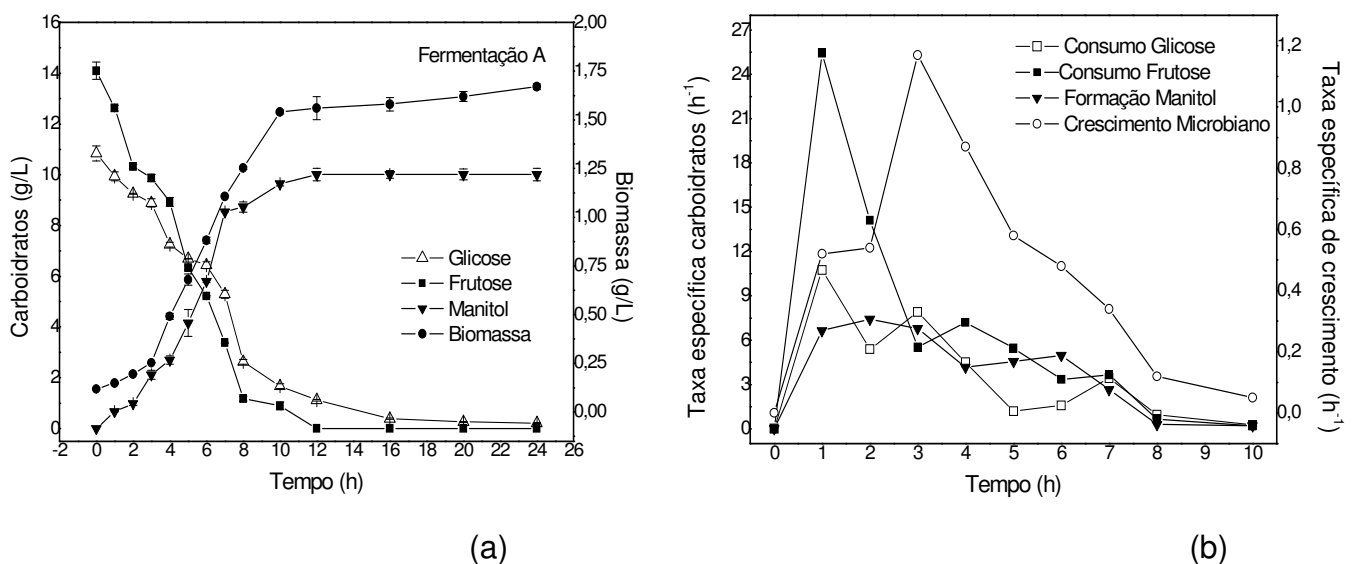
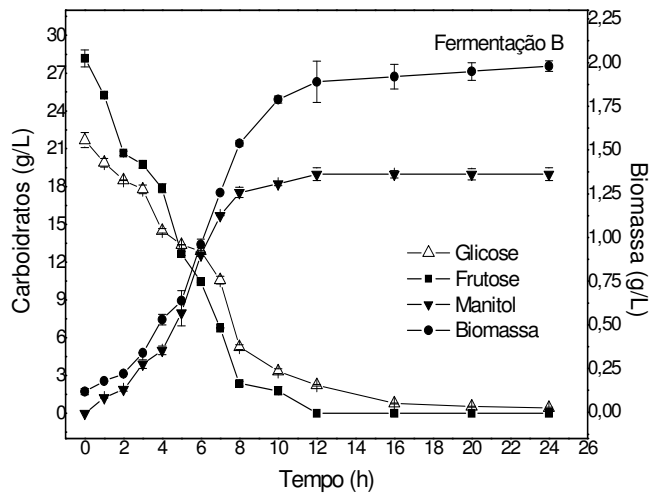
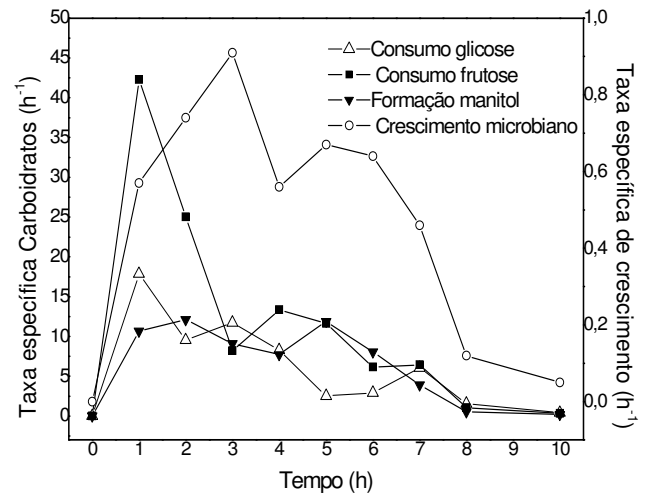


FIGURA 2 – (a) Perfil de carboidratos e biomassa para o meio de cultura A; (b) Taxas cinéticas para consumo de carboidratos e formação de biomassa e manitol para o meio de cultura A.

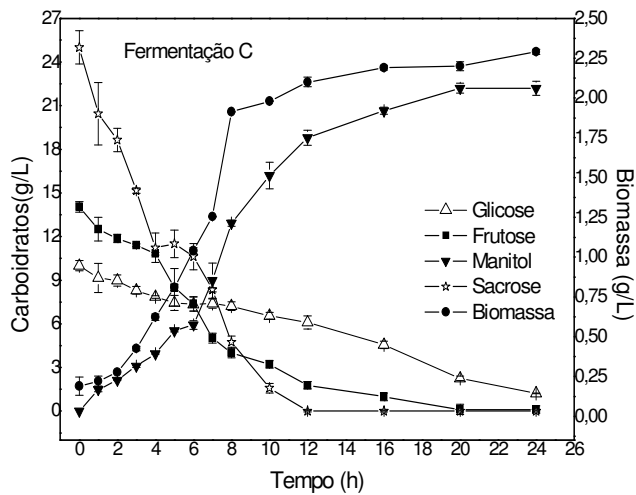


(a)

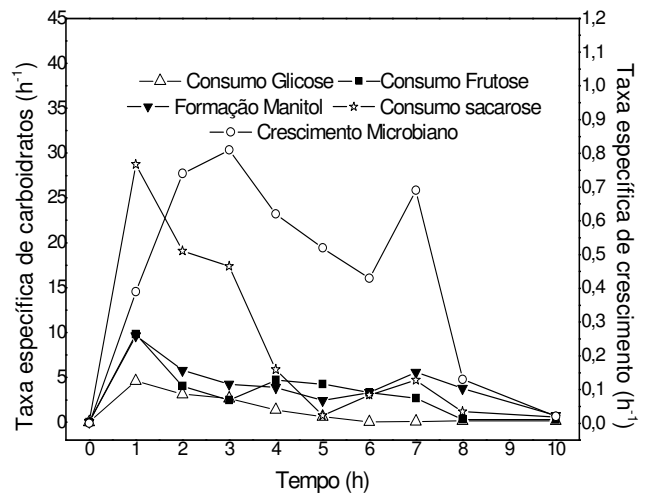


(b)

FIGURA 3 – (a) Perfil de carboidratos e biomassa para o meio de cultura B; (b) Taxas cinéticas para consumo de carboidratos e formação de biomassa e manitol para o meio de cultura B.



(a)



(b)

FIGURA 4 – (a) Perfil de carboidratos e biomassa para o meio de cultura C; (b) Taxas cinéticas para consumo de carboidratos e formação de biomassa e manitol para o meio de cultura C.

Na FIGURA 2b, 3b, 4b, são apresentadas as taxas cinéticas para consumo de carboidratos, e formação de biomassa e manitol. As taxas obtidas após 10 h de fermentação foram muito pequenas (resultados não demonstrados). Nos meios sem sacarose, elevada taxa de consumo de frutose foi observada, iniciando-se um rápido decréscimo após 3 h de fermentação (FIG. 2b, 3b). O meio contendo sacarose apresentou comportamento similar, no entanto, com menores taxas. Em todos os ensaios, após 3 h de fermentação, houve um decréscimo da taxa de consumo da frutose, que alcançou valores nulos em 10 h de fermentação. A glicose apresentou-se como a fonte de carbono com menores taxas de consumo em todos os meios de cultura testados. Maiores taxas de produção de manitol foram observadas nos meio de cultura contendo 50 g/L de fonte de carbono (FIG. 3b, 4b). Em todos os meios de cultura testados, a taxa de formação de manitol foi acompanhada da taxa de consumo de frutose, e apresentou o mesmo perfil da taxa de crescimento microbiano, demonstrando que a produção de manitol associada ao crescimento microbiano.

O meio de cultura A apresentou a maior taxa de crescimento microbiano ( $\mu_{\text{máx}} = 1,17 \text{ h}^{-1}$ ), seguido pelo meio de cultura B ( $\mu_{\text{máx}} = 0,91 \text{ h}^{-1}$ ). A menor taxa específica de crescimento microbiano foi obtida no meio C ( $\mu_{\text{máx}} = 0,81 \text{ h}^{-1}$ ). A taxa máxima de crescimento microbiano foi observada em 3 horas de fermentação, para todos os meios testados. Dols *et al.* (1998), reportaram para o *Leuconostoc mesenteroides* B-1299, uma taxa de crescimento de  $0,58 \text{ h}^{-1}$  em glicose; de  $0,60 \text{ h}^{-1}$  em frutose; de  $0,60 \text{ h}^{-1}$  em mistura de glicose e frutose; e de  $0,98 \text{ h}^{-1}$  em sacarose como único substrato. Grobben *et al.* (2001), reportaram para o *L. pseudomesenteroides* taxa de crescimento de  $0,55 \text{ h}^{-1}$  em frutose. Chagas *et al.* (2007), apresentaram taxa de crescimento de  $0,40 \text{ h}^{-1}$  para o *L. mesenteroides* B 512F numa mistura de suco de caju e sacarose. Desta forma, a taxa de crescimento microbiano obtida neste estudo cinético foi superior às taxas reportadas nos outros estudos. Após 12 h de fermentação, obteve-se um rendimento de 70 % em manitol. Maior rendimento em manitol (85 %) foi alcançado em 20 h de fermentação no meio de cultura C (FIG. 5). Neste tempo, todos os substratos viáveis para produção de manitol (sacarose e frutose) foram totalmente consumidos (FIG. 4a). O rendimento em manitol obtido neste estudo foi aproximadamente, 25% maior que o rendimento máximo teórico reportado para linhagens de *Leuconostoc* (60%), conforme descrito por Wisselink *et al.* (2002).



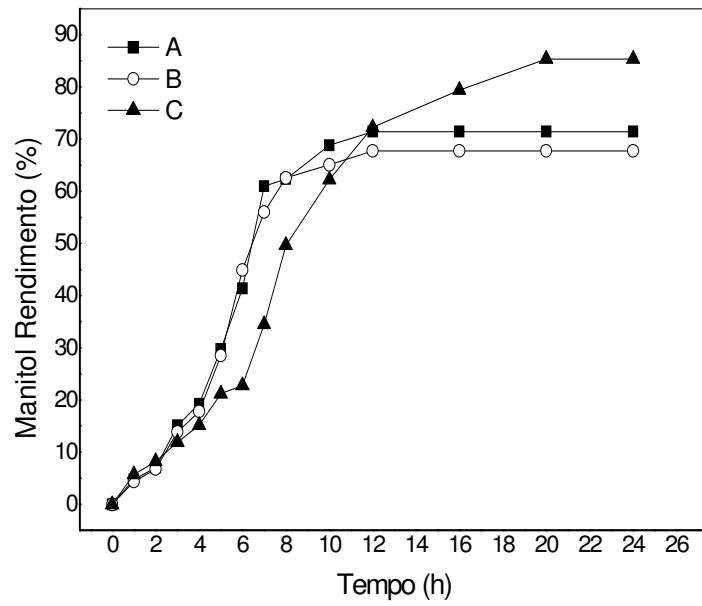


FIGURA 5 – Comparativo do rendimento de manitol obtido para os meios de cultura A, B e C.

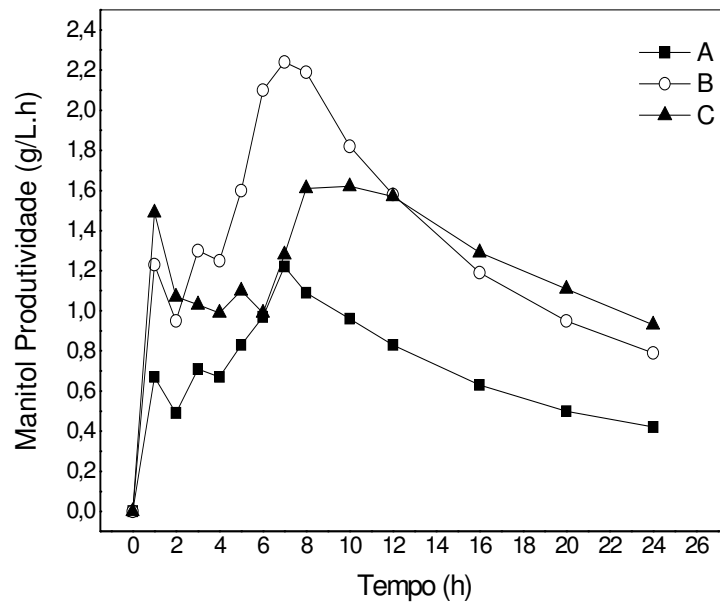


FIGURA 6 – Comparativo da produtividade de manitol obtida para os meios de cultura A, B e C.

Na FIGURA 6 é demonstrado que uma maior produtividade em manitol foi obtida no meio de cultura B ( $2,2 \text{ g/L} \cdot \text{h}^{-1}$ ), seguida pelo meio de cultura C ( $1,6 \text{ g/L} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Uma menor produtividade foi apresentada no meio de cultura A. Em todos os meios testados, uma produtividade máxima foi alcançada quando o rendimento em manitol foi de aproximadamente 62%.

No entanto, em um processo industrial além da concentração final e do rendimento do produto de interesse, também são analisados, os custos do processo. Assim, uma boa conversão de frutose a manitol foi alcançada aplicando-se somente suco de caju como substrato (meio de cultura B) em 10h de fermentação. Nessas condições, o processo rendeu  $18,0 \text{ g/L}$  de manitol com conversão de  $0,67 \text{ g/g}$  de frutose e uma produtividade volumétrica de  $1,8 \text{ g/L.h}^{-1}$ . Para o mesmo tempo de processo, o meio de cultura com adição de sacarose (meio C) apresentou uma concentração final de manitol de  $16 \text{ g/L}$  com uma conversão de frutose a manitol de  $0,62 \text{ g/g}$  de frutose. (FIG. 5) e uma produtividade de  $1,6 \text{ g/L.h}^{-1}$ . Maiores concentrações de manitol ( $22 \text{ g/L}$ ) foram atingidas somente após 20 h de fermentação correspondendo a uma maior conversão de frutose ( $0,85 \text{ g/g}$  de frutose), mas com menor produtividade. Neste caso, a diferença na concentração de manitol entre os meios B e C, em 10 h de fermentação, foi de apenas  $2 \text{ g/L}$ .

Em meio contendo quantidades equimolares de glicose e frutose, Salou *et al.* (1994) observaram que 83% da frutose foi convertida a manitol pelo *L. oeni* com pouca produtividade ( $0,2 \text{ g/L.h}^{-1}$ ). Yun e Kin (1998) reportaram uma conversão de 86% de frutose a manitol pelo *Lactobacillus sp.* e 65% pelo *Leuconostoc sp.*, cultivados em condições ótimas de crescimento. Ambas as linhagens apresentaram produtividade inferior a  $1,0 \text{ g/L.h}^{-1}$ . Honorato *et al* (2007) reportou produção de  $17,44 \text{ g/L}$  de manitol em uma mistura contendo suco de caju (glicose e frutose) e sacarose. Grobber *et al.* (2001) apresentaram conversão de 65% de frutose a manitol quando somente frutose foi utilizada e de 95% quando uma mistura de glicose e frutose foi aplicada a uma proporção de 1:2 (glicose : frutose).

A produtividade e o rendimento obtidos foram menores que os reportados por outros autores, contudo, nestes processos foram utilizadas condições ótimas de processo e meio de cultura otimizado contendo uma mistura frutose : glicose numa proporção (2:1), condição ótima para produção de manitol por bactérias lácticas já que uma molécula de frutose é necessária para regeneração de  $\text{NAD}^+$ . Ao suco de caju, faz-se necessária a adição de frutose para alcançar as condições otimizadas da relação frutose:glicose.

#### 4.3 Otimização do meio de cultura para produção de manitol utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio

Com base nos resultados acima, realizou-se um estudo para otimização da composição de um meio de cultura para produção de manitol utilizando-se o suco de caju como substrato e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio em substituição do extrato de levedura. As TABELAS 6 e 7 apresentam as condições experimentais e os resultados onde foi avaliada a biomassa formada no final da fermentação de acordo com um planejamento experimental apresentado na TABELA 4. Na determinação da biomassa foi desconsiderada a biomassa inicial.

TABELA 6 - Planejamento experimental e resultados obtidos de biomassa e manitol para o *Leuconostoc mesenteroides* B-512F cultivado em suco de caju.

| Ensaio | Açúcar redutor (g/L) | Sulfato de amônio (g/L) | Biomassa (g/L) |
|--------|----------------------|-------------------------|----------------|
| 1      | 25                   | 0,0                     | 0,69±0,01      |
| 2      | 25                   | 12,0                    | 0,84±0,02      |
| 3      | 50                   | 0,0                     | 0,92±0,00      |
| 4      | 50                   | 12,0                    | 1,01±0,07      |
| 5      | 25                   | 6,0                     | 0,75±0,00      |
| 6      | 50                   | 6,0                     | 0,92±0,02      |
| 7      | 37,5                 | 0,0                     | 0,73±0,01      |
| 8      | 37,5                 | 12,0                    | 0,91±0,02      |
| 9 (C)  | 37,5                 | 6,0                     | 0,91±0,06      |
| 10(C)  | 37,5                 | 6,0                     | 0,87±0,03      |
| 11(C)  | 37,5                 | 6,0                     | 0,87±0,02      |

TABELA 7 - Planejamento experimental e resultados obtidos de biomassa e manitol para o *Leuconostoc mesenteroides* B-742 cultivado em suco de caju.

| Ensaio | Açúcar redutor (g/L) | Sulfato de amônio (g/L) | Biomassa (g/L) |
|--------|----------------------|-------------------------|----------------|
| 1      | 25                   | 0,0                     | 0,74±0,00      |
| 2      | 25                   | 12,0                    | 1,01±0,08      |
| 3      | 50                   | 0,0                     | 0,79±0,01      |
| 4      | 50                   | 12,0                    | 1,15±0,00      |
| 5      | 25                   | 6,0                     | 0,99±0,10      |
| 6      | 50                   | 6,0                     | 1,29±0,07      |
| 7      | 37,5                 | 0,0                     | 0,84±0,02      |
| 8      | 37,5                 | 12,0                    | 1,06±0,10      |
| 9 (C)  | 37,5                 | 6,0                     | 1,13±0,00      |
| 10(C)  | 37,5                 | 6,0                     | 1,23±0,10      |
| 11(C)  | 37,5                 | 6,0                     | 0,97±0,00      |

Nas TABELAS 8 e 9 estão apresentados os efeitos das variáveis independentes na concentração de biomassa no final da fermentação, para o *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e B-742 respectivamente.

TABELA 8 - Efeitos estimados para a biomassa (*L. mesenteroides* B-512F)

| Fator                 | Biomassa |       |
|-----------------------|----------|-------|
|                       | Efeito   | S.E.  |
| Média                 | 0,87*    | 0,02* |
| Açúcar redutor (L)    | 0.19*    | 0,03* |
| Açúcar redutor (Q)    | 0.00     | 0,04  |
| Sulfato de Amônio (L) | 0.13*    | 0,03* |
| Sulfato de Amônio (Q) | -0.03    | 0,04  |
| Açúcar x Sulfato      | -0.03    | 0,03  |

\* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

TABELA 9 - Efeitos estimados para a biomassa (*L. mesenteroides* B-742)

| Fator                 | Biomassa |       |
|-----------------------|----------|-------|
|                       | Efeito   | S.E.  |
| Média                 | 1,12*    | 0,05* |
| Açúcar redutor (L)    | 0,16     | 0,08* |
| Açúcar redutor (Q)    | -0,003   | 0,12  |
| Sulfato de Amônio (L) | 0,28*    | 0,08* |
| Sulfato de Amônio (Q) | -0,37*   | 0,12  |
| Açúcar x Sulfato      | 0,03     | 0,10  |

\* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

Os modelos de regressão obtidos para a biomassa do *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e B-742 respectivamente, estão expressos pelas equações 2 e 3. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão é apresentada nas TABELAS 10 e 11, respectivamente.

$$\begin{aligned}
 \text{Biomassa (g / L)} = & 0,45 + 8,9 \times 10^{-3} AR + 2,4 \times 10^{-2} SA - 4,20 \times 10^{-4} SA^2 \\
 & - 2,1 \times 10^{-4} AR \cdot SA
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Biomassa (g / L)} = & 0,59 + 5,8 \times 10^{-3} AR - 1,3 \times 10^{-5} AR^2 + 7,6 \times 10^{-2} SA - 5,2 \times 10^{-3} SA^2 \\
 & + 2,6 \times 10^{-4} AR \cdot SA
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

Onde:

AR concentração de açúcar redutor (g/L)

SA concentração de sulfato de amônio (g/L)

TABELA 10. Análise de variância para a biomassa de *L. mesenteroides* B-512F (Eq 05).

| Fonte de variação         | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | Valor de <i>F</i> |
|---------------------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Regressão                 | 0,08            | 5                  | 0,0172           | 11,46             |
| Residual                  | 0,007           | 5                  | 0,0015           |                   |
| Total                     | 0,093           | 10                 |                  |                   |
| Coeficiente de correlação | 0,91            |                    |                  |                   |
| <i>F</i> tabelado (95%)   |                 |                    |                  | $F_{5,5} = 5,05$  |

TABELA 11. Análise de variância para a biomassa de *L. mesenteroides* B-742 (Eq 06).

| Fonte de variação         | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | Valor de <i>F</i> |
|---------------------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Regressão                 | 0,26            | 5                  | 0,052            | 5,20              |
| Residual                  | 0,05            | 5                  | 0,01             |                   |
| Total                     | 0,31            | 10                 |                  |                   |
| Coeficiente de correlação | 0,83            |                    |                  |                   |
| <i>F</i> tabelado (95%)   |                 |                    |                  | $F_{5,5} = 5,05$  |

De acordo com as TABELAS 10 e 11, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, para as duas linhagens testadas, tendo em vista que os valores de *F*, com 95% de confiança, calculados para os modelos obtidos foram 11,46, e 5,20, maiores que o valor de *F* tabelado (5,05).

Conforme podemos observar nas TABELAS 6 e 7, houve uma considerável produção de biomassa nos meios, por ambos os microrganismos, demonstrando uma boa adaptação dos mesmos, com uma produção máxima de biomassa, em concentrações de 50g/L de açúcares redutores e 12,0 g/L de sulfato de amônio. Verificamos ainda, que o *Leuconostoc mesenteroides* B-742 apresenta um crescimento ligeiramente maior comparado ao *L. mesenteroides* B-512F.

Rabelo (2007) observou que é possível a utilização de um meio de cultura contendo uma menor quantidade de extrato de levedura em combinação com sulfato de amônio, ao cultivar o *Leuconostoc mesenteroides* B-742 em meio sintético para produção da enzima dextrana-sacarase.

Os resultados de biomassa apresentados nas TABELAS 6 e 7 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft). As FIGURAS 7 e 8 apresentam as superfícies de resposta obtidas para esta variável (Eq. 5 e 6).

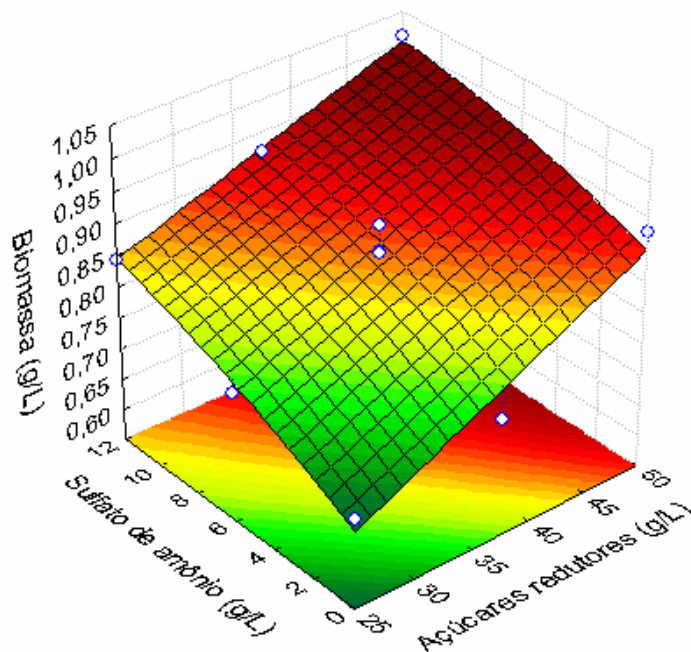


FIGURA 7 - Superfície de resposta para a biomassa (*Leuconostoc mesenteroides* B-512F) na fermentação do suco de caju clarificado.

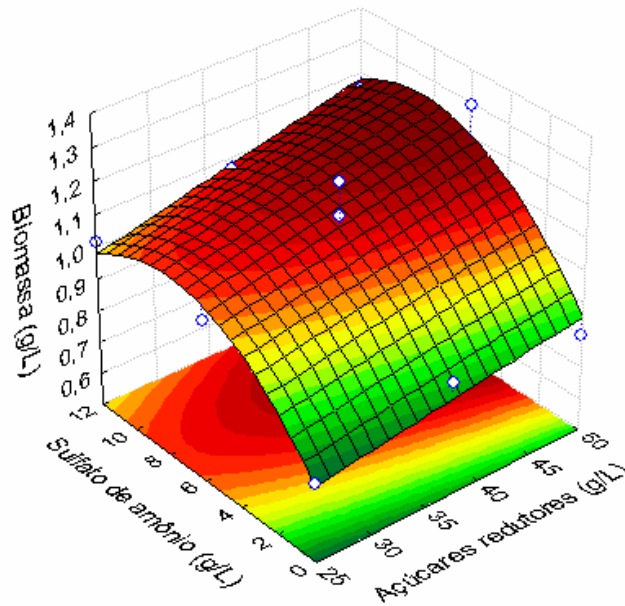


FIGURA 8 - Superfície de resposta para a biomassa produzida (*Leuconostoc mesenteroides* B-742) na fermentação do suco de caju clarificado.

Observou-se que o aumento da concentração de açúcar redutor e de sulfato de amônio, contribui para o crescimento do *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, obtendo-se uma produção máxima de biomassa, de aproximadamente 1,01 g/L (FIGURA 7).

Para o *Leuconostoc mesenteroides* B-742, também foi observado que o aumento na concentração de açúcares redutores e de sulfato de amônio influencia positivamente para o aumento da biomassa, com uma produção máxima de 1,15 g/L. No entanto, quando a concentração de açúcar redutor é superior a de 37,5 g/L, e para concentrações de sulfato superiores a 6,0 g/L há queda do crescimento microbiano (FIGURA 8).



Nas TABELAS 12 e 13 são apresentados os resultados obtidos quanto ao manitol produzido, frutose e glicose consumida de acordo com o planejamento experimental apresentado na TABELA 4, para o *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e B-742 respectivamente.

TABELA 12 – Manitol produzido e frutose consumida na fermentação do suco de caju de acordo com planejamento experimental (TABELA 4) para o *Leuconostoc mesenteroides* B-512F

| <b>Ensaio</b> | <b>Manitol (g/L)</b> | <b>Frutose consumida (%)</b> | <b>Rendimento Manitol (%)</b> |
|---------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1             | 4,83±0,14            | 68,23                        | 56,65                         |
| 2             | 4,54±0,14            | 91,39                        | 39,73                         |
| 3             | 10,66±0,04           | 78,08                        | 54,65                         |
| 4             | 9,41±0,04            | 79,43                        | 47,40                         |
| 5             | 4,24±0,06            | 94,96                        | 35,72                         |
| 6             | 12,13±0,29           | 68,88                        | 70,45                         |
| 7             | 9,10±0,52            | 62,24                        | 77,98                         |
| 8             | 8,41±0,37            | 65,24                        | 68,74                         |
| 9             | 11,02±0,31           | 64,76                        | 90,79                         |
| 10            | 10,98±0,02           | 63,08                        | 92,85                         |
| 11            | 10,31±0,06           | 61,99                        | 88,72                         |

TABELA 13 – Manitol produzido e frutose consumida na fermentação do suco de caju de acordo com planejamento experimental (TABELA 4) para o *Leuconostoc mesenteroides* B-742

| <b>Ensaio</b> | <b>Manitol (g/L)</b> | <b>Frutose consumida (%)</b> | <b>Rendimento Manitol (%)</b> |
|---------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1             | 2,81±0,06            | 89,64                        | 25,12                         |
| 2             | 3,89±0,11            | 93,86                        | 33,16                         |
| 3             | 6,46±0,23            | 71,77                        | 36,02                         |
| 4             | 6,65±0,16            | 63,04                        | 42,20                         |
| 5             | 3,25±0,16            | 92,60                        | 28,15                         |
| 6             | 6,77±0,00            | 80,33                        | 33,74                         |
| 7             | 5,56±0,16            | 79,27                        | 37,43                         |
| 8             | 7,49±0,29            | 74,02                        | 53,96                         |
| 9             | 10,62±0,16           | 60,06                        | 94,36                         |
| 10            | 10,73±0,02           | 61,27                        | 93,40                         |
| 11            | 10,54±0,04           | 60,88                        | 92,36                         |

Na TABELAS 14 e 15 são apresentados os efeitos das variáveis independentes na produção de manitol no final da fermentação, para o *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e B-742, respectivamente.

TABELA 14. Efeitos estimados para o manitol produzido (*L. mesenteroides* B-512F)

| Fator                 | Manitol |        |
|-----------------------|---------|--------|
|                       | Efeito  | S.E.   |
| Média                 | 87,85*  | 4,99*  |
| Açúcar redutor (L)    | 13,46   | 7,94   |
| Açúcar redutor (Q)    | -60,71* | 12,22* |
| Sulfato de Amônio (L) | -11,13  | 7,94   |
| Sulfato de Amônio (Q) | -20,16  | 12,22  |
| Açúcar x Sulfato      | 4,83    | 9,73   |

\* significativo num intervalo de confiança de 95%

TABELA 15. Efeitos estimados para o manitol produzido (*L. mesenteroides* B-742)

| Fator                 | Manitol |        |
|-----------------------|---------|--------|
|                       | Efeito  | S.E.   |
| Média                 | 82,67*  | 9,38*  |
| Açúcar redutor (L)    | 8,51    | 14,93  |
| Açúcar redutor (Q)    | -71,31* | 22,97* |
| Sulfato de Amônio (L) | 10,24   | 14,93  |
| Sulfato de Amônio (Q) | -41,82  | 22,97  |
| Açúcar x Sulfato      | -0,92   | 18,28  |

\* significativo num intervalo de confiança de 95%

As equações 4 e 5, representam o modelo de regressão para o manitol produzido pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e B-742, respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Manitol (g / L)} = & 18,13 + 1,20AR - 1,25 \times 10^{-2} AR^2 + 5,21 \times 10^{-1} SA - 3,86 \times 10^{-2} SA^2 \\ & - 3,20 \times 10^{-3} AR \cdot SA \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \text{Manitol (g / L)} = & -29,73 + 1,82AR - 2,23 \times 10^{-2} AR^2 + 8,59 \times 10^{-1} SA - 5,50 \times 10^{-2} SA^2 \\ & - 3,0 \times 10^{-4} AR \cdot SA \end{aligned} \quad (5)$$

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão é apresentada nas TABELAS 16 e 17, respectivamente.

TABELA 16. Análise de variância para o manitol produzido pelo *L. mesenteroides* B-512F (Eq 07).

| Fonte de variação         | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | Valor de <i>F</i> |
|---------------------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Regressão                 | 78,42           | 5                  | 15,684           | 23,27             |
| Residual                  | 3,37            | 5                  | 0,674            |                   |
| Total                     | 81,79           | 10                 |                  |                   |
| Coeficiente de correlação | 0,95            |                    |                  |                   |
| <i>F</i> tabelado (95%)   |                 |                    |                  | $F_{5,5} = 5,05$  |

TABELA 17. Análise de variância para o manitol produzido pelo *L.mesenteroides* B-742 (Eq 08).

| Fonte de variação         | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática | Valor de <i>F</i> |
|---------------------------|-----------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Regressão                 | 72,2            | 5                  | 14,44            | 6,60              |
| Residual                  | 10,93           | 5                  | 2,186            |                   |
| Total                     | 83,13           | 10                 |                  |                   |
| Coeficiente de correlação | 0,86            |                    |                  |                   |
| <i>F</i> tabelado (95%)   |                 |                    |                  | $F_{5,5} = 5,05$  |

De acordo com as TABELAS 16 e 17, verificamos que o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, para as duas linhagens, quanto à produção de manitol, tendo em vista que os valores de *F*, com 95% de confiança, calculados para o modelo foram maiores que o valor de *F* tabelado (5,05).

Os resultados apresentados nas TABELAS 12 e 13 demonstram que as melhores condições para uma máxima produção de manitol, foram alcançadas quando concentrações intermediárias de açúcares redutores (37,5 g/ L) e de sulfato de amônio (6,0 g/L) foram empregadas, com um rendimento superior a 90% para as duas linhagens, caracterizando, que nessas condições, houve uma satisfatória utilização da frutose presente, pelos microrganismos, convertendo-a a manitol em uma rota paralela.

Os resultados de manitol apresentados nas TABELAS 12 e 13 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft). As FIGURAS 9 e 10 apresentam as superfícies de resposta obtidas para o manitol (Eq. 7 e 8).

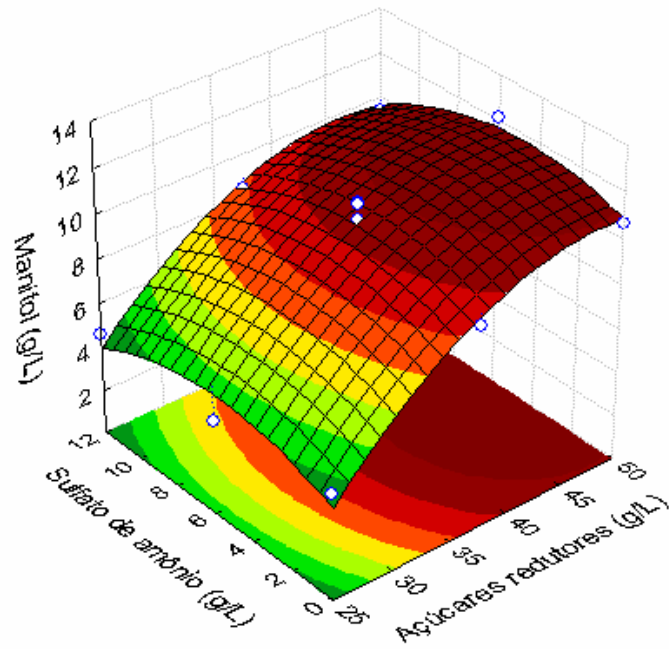


FIGURA 9 - Superfície de resposta para manitol produzido (*Leuconostoc mesenteroides* B-512F) na fermentação do suco de caju clarificado.

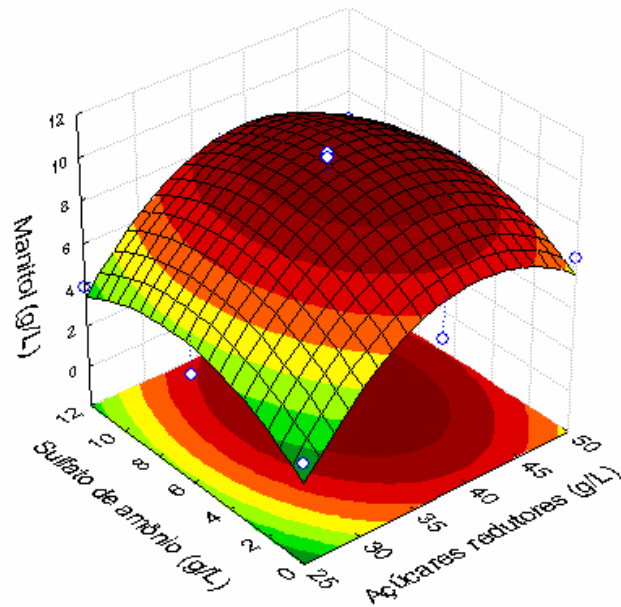


FIGURA 10 - Superfície de resposta para manitol produzido (*Leuconostoc mesenteroides* B-742) na fermentação do suco de caju clarificado.

Com base nos resultados apresentados na FIGURA 9 observa-se que o açúcar redutor influencia diretamente na produção de manitol, apresentando um efeito consideravelmente superior ao do sulfato de amônio, que por sua vez, promove um discreto aumento na produção de manitol. De forma similar, tanto o aumento da concentração de açúcar redutor quanto o de sulfato de amônio promovem o aumento da produção de manitol, sendo mais evidente o efeito do açúcar redutor (FIGURA 10).

Nas FIGURAS 9 e 10, verificou-se ainda que concentrações de açúcar redutor e de sulfato de amônio superiores a 37,5 g/L e 6,0 g/L, respectivamente, não exercem melhoria significativa para a produção de manitol, sugerindo que as duas linhagens estudadas apresentam comportamento similar quanto à produção de manitol. Desta forma, o meio composto por suco de caju combinado com sulfato de amônio constitui-se uma interessante alternativa para o processo fermentativo, além de ser economicamente viável, uma vez que o suco de caju é oriundo de um produto agrícola, e o sulfato de amônio apresenta custo bastante inferior ao extrato de levedura, comumente utilizado em processos fermentativos.

Os resultados acima apresentados são superiores aos obtidos no estudo cinético para produção de manitol no qual foi utilizado extrato de levedura como fonte de nitrogênio (85%). Grobber *et al.* (2001) obteve uma conversão de 95% de frutose a manitol quando uma mistura de glicose e frutose foi utilizada na proporção de 1:2 (glicose: frutose). Soetaert *et al.* (1990) apresentou um rendimento de 94% em cultivo batelada alimentada.

#### 4.4 Estudo do controle do pH na produção de manitol

AS TABELAS 18 e 19 apresentam os resultados para biomassa, consumo de glicose e frutose e manitol formado pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e *Leuconotoc mesenteroides* B-742, respectivamente, no meio contendo suco de caju clarificado suplementado de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, durante os ensaios com controle de pH em 6,5.

TABELA 18. Resultados de biomassa, consumo de glicose e frutose e produtividade em manitol na fermentação do suco de caju suplementado com sulfato de amônio (6,0 g/L) pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, com controle de pH em 6,5.

| pH 6,5    |                |               |               |  |
|-----------|----------------|---------------|---------------|--|
| Tempo (h) | Biomassa (g/L) | Glicose (g/L) | Frutose (g/L) | Produtividade manitol (g/L.h <sup>-1</sup> ) |
| 0         | 0,26±0,00      | 15,86±0,79    | 14,34±0,71    | 0  |
| 1         | 0,27±0,00      | 14,43±0,72    | 12,35±0,61    | 3,84   |
| 2         | 0,45±0,03      | 13,16±0,65    | 10,37±0,51    | 2,46   |
| 3         | 0,46±0,00      | 11,34±0,56    | 9,56±0,47     | 2,91   |
| 4         | 0,58±0,07      | 9,85±0,49     | 9,06±0,45     | 2,18   |
| 5         | 0,67±0,08      | 8,06±0,40     | 6,17±0,30     | 1,79   |
| 6         | 0,74±0,03      | 7,33±0,36     | 4,41±0,22     | 1,53   |
| 7         | 0,83±0,00      | 7,21±0,36     | 3,88±0,19     | 1,51   |
| 8         | 0,88±0,00      | 6,52±0,32     | 3,50±0,17     | 1,36   |
| 9         | 1,06±0,05      | 6,27±0,31     | 3,00±0,15     | 1,24   |
| 10        | 1,18±0,02      | 5,94±0,29     | 2,84±0,14     | 1,17   |
| 11        | 1,22±0,00      | 5,24±0,26     | 2,74±0,13     | 1,00   |
| 12        | 1,26±0,00      | 4,67±0,23     | 2,63±0,13     | 0,90   |
| 14        | 1,39±0,01      | 4,30±0,21     | 0,00±0,00     | 0,66   |

TABELA 19. Resultados de biomassa, consumo de glicose e frutose e produtividade em manitol na fermentação do suco de caju suplementado com sulfato de amônio (6,0 g/L) pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-742, com controle de pH em 6,5.

| pH 6,5    |                |               |               |  |
|-----------|----------------|---------------|---------------|--|
| Tempo (h) | Biomassa (g/L) | Glicose (g/L) | Frutose (g/L) | Produtividade manitol (g/L.h <sup>-1</sup> ) |
| 0         | 0,352±0,00     | 13,40±0,67    | 19,61±0,98    | 0  |
| 1         | 0,374±0,00     | 13,34±0,66    | 17,67±0,88    | 5,73   |
| 2         | 0,416±0,00     | 13,25±0,66    | 17,31±0,86    | 3,36   |
| 3         | 0,655±0,00     | 12,88±0,64    | 16,95±0,84    | 1,95   |
| 4         | 0,768±0,01     | 12,25±0,61    | 16,37±0,81    | 2,21   |
| 5         | 0,901±0,04     | 10,25±0,51    | 13,88±0,69    | 2,19   |
| 6         | 0,969±0,02     | 9,88±0,49     | 12,89±0,64    | 1,98   |
| 7         | 1,017±0,03     | 8,94±0,44     | 11,40±0,57    | 1,92   |
| 8         | 1,017±0,02     | 8,70±0,43     | 10,73±0,53    | 1,89   |
| 9         | 1,019±0,01     | 8,27±0,41     | 10,23±0,51    | 1,72   |
| 10        | 1,039±0,02     | 8,06±0,40     | 9,87±0,49     | 1,60   |
| 11        | 1,077±0,03     | 7,61±0,38     | 8,38±0,41     | 1,49   |
| 12        | 1,125±0,00     | 7,33±0,36     | 7,44±0,37     | 1,38   |
| 14        | 1,290±0,03     | 7,12±0,35     | 6,90±0,34     | 1,19   |
| 16        | 1,320±0,02     | 7,00±0,35     | 6,44±0,32     | 1,00   |
| 23        | 1,411±0,02     | 6,94±0,34     | 6,26±0,31     | 0,71   |

AS TABELAS 20 e 21 apresentam os resultados para biomassa, consumo de glicose e frutose e manitol formado pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e *Leuconostoc mesenteroides* B-742, respectivamente, no meio contendo suco de caju clarificado suplementado de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, durante os ensaios com controle de pH em 5,0.



TABELA 20. Resultados de biomassa, consumo de glicose e frutose e produtividade em manitol na fermentação do suco de caju suplementado com sulfato de amônio (6,0 g/L) pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, com controle de pH em 5,0.

| pH 5,0    |                |               |               |  |
|-----------|----------------|---------------|---------------|--|
| Tempo (h) | Biomassa (g/L) | Glicose (g/L) | Frutose (g/L) | Produtividade manitol (g/L.h <sup>-1</sup> ) |
| 0         | 0,24±0,00      | 14,79±0,74    | 19,86±0,99    | 0  |
| 1         | 0,27±0,00      | 13,34±0,66    | 17,06±0,85    | 4,47   |
| 2         | 0,45±0,03      | 13,22±0,66    | 16,16±0,80    | 2,90   |
| 3         | 0,58±0,00      | 12,73±0,63    | 14,58±0,72    | 2,25   |
| 4         | 0,64±0,02      | 11,76±0,58    | 12,46±0,62    | 1,99   |
| 5         | 0,73±0,03      | 11,52±0,57    | 11,02±0,55    | 1,86   |
| 6         | 0,76±0,01      | 11,31±0,56    | 9,80±0,49     | 1,92   |
| 7         | 0,79±0,02      | 11,00±0,55    | 8,09±0,40     | 1,88   |
| 8         | 0,80±0,06      | 10,61±0,53    | 6,60±0,33     | 1,79   |
| 9         | 0,81±0,00      | 10,31±0,51    | 5,88±0,29     | 1,87   |
| 10        | 0,82±0,01      | 9,94±0,49     | 4,88±0,24     | 1,76   |
| 11        | 0,89±0,01      | 9,40±0,47     | 3,44±0,17     | 1,66   |
| 12        | 0,89±0,07      | 7,88±0,39     | 1,59±0,07     | 1,59   |
| 14        | 0,97±0,01      | 7,52±0,37     | 0,21±0,01     | 1,29   |

TABELA 21. Resultados de biomassa, consumo de glicose e frutose e produtividade em manitol na fermentação do suco de caju suplementado com sulfato de amônio (6,0 g/L) pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-742, com controle de pH em 5,0.

| <b>pH 5,0</b>    |                       |                      |                      |   |
|------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---|
| <b>Tempo (h)</b> | <b>Biomassa (g/L)</b> | <b>Glicose (g/L)</b> | <b>Frutose (g/L)</b> | <b>Produtividade manitol (g/L.h<sup>-1</sup>)</b> |
| 0                | 0,38±0,01             | 13,88±0,69           | 16,18±0,80           | 0   |
| 1                | 0,59±0,05             | 13,34±0,67           | 11,68±0,58           | 2,19  |
| 2                | 0,64±0,00             | 13,13±0,66           | 10,73±0,53           | 1,54  |
| 3                | 0,83±0,01             | 12,34±0,62           | 9,10±0,45            | 1,57  |
| 4                | 1,02±0,07             | 11,67±0,58           | 7,84±0,37            | 1,52  |
| 5                | 1,25±0,04             | 11,40±0,57           | 6,62±0,33            | 1,69  |
| 6                | 1,28±0,02             | 10,73±0,54           | 4,34±0,21            | 1,68  |
| 7                | 1,31±0,01             | 10,37±0,52           | 3,02±0,15            | 1,66  |
| 8                | 1,42±0,09             | 10,31±0,52           | 1,95±0,09            | 1,49  |
| 9                | 1,43±0,01             | 10,25±0,51           | 1,24±0,06            | 1,43  |
| 10               | 1,55±0,00             | 9,67±0,48            | 0,65±0,03            | 1,32  |
| 11               | 1,67±0,02             | 9,40±0,47            | 0,00±0,00            | 1,21  |
| 13               | 1,69±0,03             | 8,24±0,41            | 0,00±0,00            | 1,04  |
| 22               | 1,70±0,00             | 7,52±0,38            | 0,00±0,00            | 0,62  |
| 26               | 1,68±0,02             | 7,09±0,35            | 0,00±0,00            | 0,56  |
| 30               | 1,60±0,06             | 6,52±0,33            | 0,00±0,00            | 0,50  |

AS FIGURAS 11a e 11b apresentam o perfil de crescimento celular e manitol produzido pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio (6,0 g/L) como fonte de nitrogênio, durante os ensaios com controle de pH.

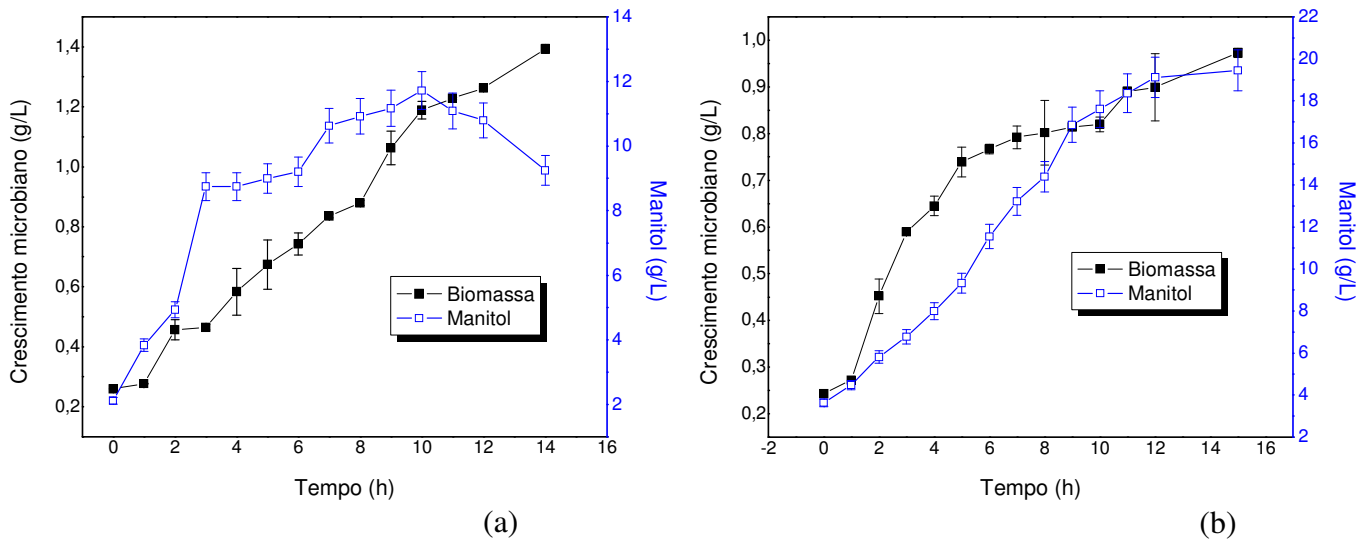


FIGURA 11. Perfil de crescimento celular e manitol produzido pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (a) pH 6,5 (b) pH 5,0.

AS FIGURAS 12a e 12b apresentam o perfil de crescimento celular e manitol produzido pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-742 no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, durante os ensaios com controle de pH.

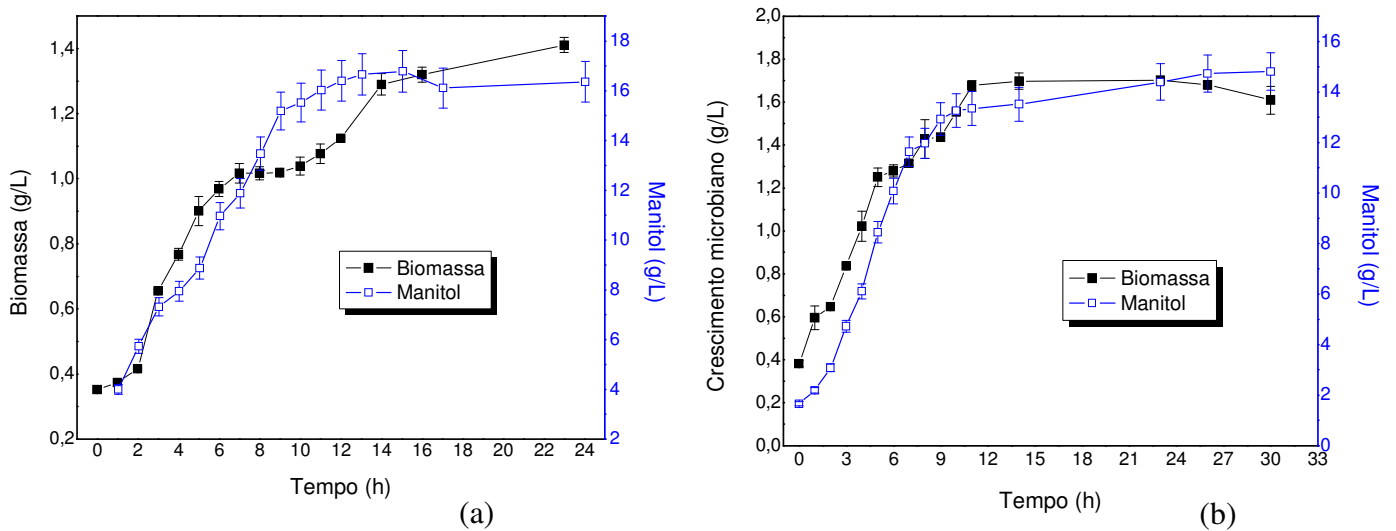


FIGURA 12. Perfil de crescimento celular e manitol produzido pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-742 no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (a) pH 6,5 (b) pH 5,0.

A FIGURA 13 apresenta um comparativo da produtividade de manitol pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, durante os ensaios com controle de pH.

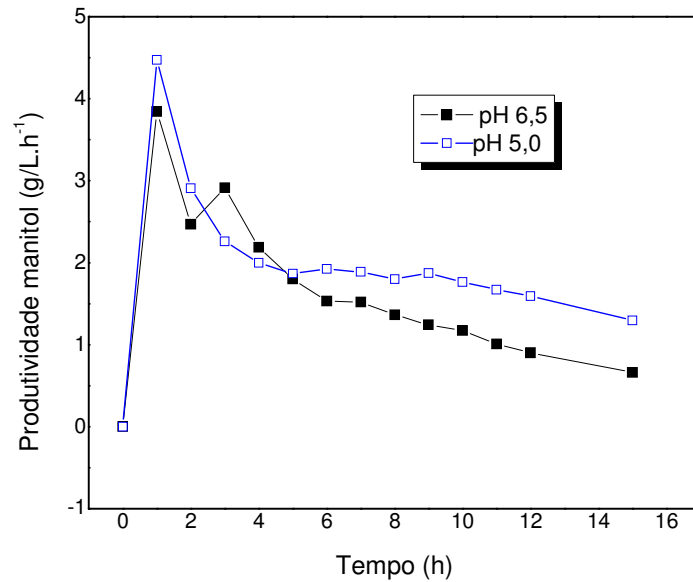


FIGURA 13. Comparativo da produtividade em manitol obtida pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, durante ensaios com controle de pH.

A FIGURA 14 apresenta um comparativo da produção de manitol pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-742 no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, durante os ensaios com controle de pH.

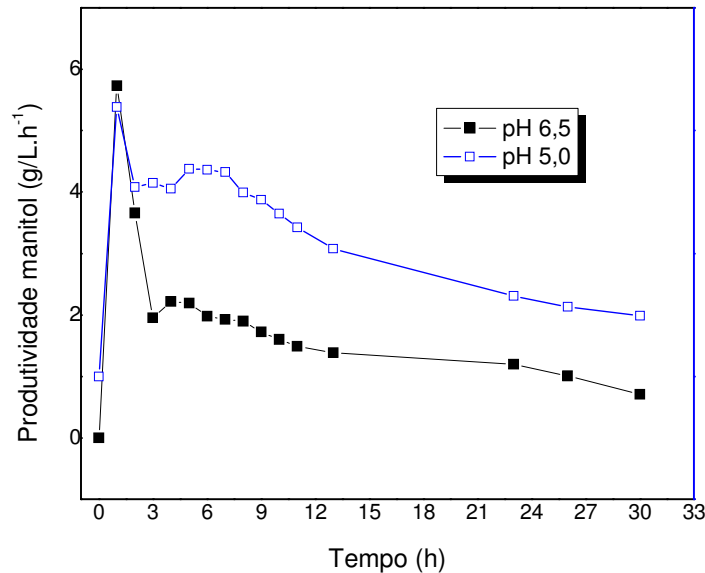


FIGURA 14. Comparativo da produtividade em manitol obtida pelo *Leuconostoc mesenteroides* B-742 no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, durante ensaios com controle de pH.

Nas FIGURAS 11a e 11b podemos observar que não houve fase LAG em nenhum dos meios estudados, caracterizando uma rápida adaptação do microrganismo ao meio de cultura constituído de suco de caju. No entanto o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* B-512F apresentou um crescimento consideravelmente maior no ensaio com controle contínuo do pH em 6,5, tendo em vista que este valor de pH é considerado ótimo para seu crescimento. Também foi observado que a formação de manitol foi associada ao crescimento microbiano.

Após 12h de fermentação, obtivemos um rendimento em manitol de 81,69% no meio com controle do pH em 6,5 e maior rendimento foi alcançado no meio com controle de pH em 5,0, de 97,93%.

Na Figura 13 é demonstrado que uma maior produtividade em manitol foi obtida no meio de cultura com controle de pH em 5,0 ( $4,4 \text{ g/L.h}^{-1}$ ), havendo uma menor produtividade foi obtida no meio de cultura com controle de pH em 6,5 ( $3,8 \text{ g/L} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Comportamento similar foi obtido por Weymarn (2002), ao avaliar a produção de manitol por diferentes bactérias ácido láticas. Embora neste ensaio, o crescimento microbiano tenha sido menor, num processo industrial são também analisados a concentração final e o rendimento do produto de interesse. Desta forma, pode-se observar claramente que a conversão de frutose a manitol é positivamente favorecida pelo controle do pH em 5,0

Para o *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (FIGURAS 12a e 12b) também observamos que não houve fase LAG em nenhum dos meios estudados, caracterizando novamente, uma rápida adaptação do microrganismo ao meio de cultura constituído de suco de caju. Comparando-se o crescimento do microrganismo nos ensaios, observamos crescimento pouco maior no meio de cultura com controle de pH em 5,0. Também observamos que a formação de manitol foi associada ao crescimento microbiano. No meio com controle de pH em 6,5, obtivemos um rendimento em manitol de 85,53% em 14 h de fermentação, enquanto que no meio com controle do pH em 5,0 obteve-se um rendimento de 91,49 %.

Na FIGURA 14 é demonstrado que uma maior produtividade máxima em manitol foi obtida no com controle de pH em 6,5 ( $5,7 \text{ g/L h}^{-1}$ ), havendo uma menor produtividade máxima com controle de pH em 5,0 ( $2,1 \text{ g/L h}^{-1}$ ). Desta forma, uma boa conversão de frutose a manitol foi alcançada em ambos os processos. Os resultados também demonstram que o a variação do pH não promoveu um aumento considerável na produção de manitol pelo microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* B-742.

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos pode-se concluir que o suco de caju clarificado por apresentar em sua composição, diversos minerais e uma expressiva quantidade de açúcares redutores, pode ser empregado como uma fonte alternativa de substrato de baixo custo para o crescimento dos microrganismos *Leuconostoc mesenteroides* B-512F e *Leuconostoc mesenteroides* B-742, e produção de manitol. Seu uso combinado com o sulfato de amônio, além de favorecer o crescimento microbiano, e a produção de manitol, possibilita uma maior redução dos custos do meio de cultura, em virtude da substituição do extrato de levedura, fonte de nitrogênio comumente empregada em processos industriais.

Ao avaliar o efeito do pH para o *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, observou-se melhores rendimentos e produtividade em manitol, no meio no qual foi realizado controle do pH em 5,0, com uma melhor conversão da frutose presente no produto de interesse. No entanto, para o *Leuconostoc mesenteroides* B-742 observou-se que a variação no pH não promoveu aumento considerável na produção de manitol pelo *Leuconostoc citreum* B-742, não exercendo influencia sobre a conversão de frutose a manitol.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AARNIKUNNAS, J. **Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds**. 2006. 67f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)** - Departamento de Ciências Veterinárias Básicas, Universidade de Helsinki, 2006.

ABREU, F. A. P. **Cajuína**. In: VENTURINI FILHO, W. G. *Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado*. São Paulo: Editora Edgard Blücher, cap. 8. p 169 - 184, 2006.

AGUIAR, L.P.  **$\beta$ -caroteno, vitamina C e outras características de qualidade de acerola, caju e melão em utilização no melhoramento genético**. 2000. 86f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)** – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

ARASARATNAM, V.; SENTHURAN, K.; BALASUBRAMANIAN, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen source for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*, **Enzyme Microb. Technology**, v. 19, p. 482 – 486, 1996.

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, 2000a.

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

BORGES, M. F.; FEITOSA, T. TAVARES, F. C. A.; OLIVEIRA, M. E. B.; BRÍGIDA, A. I. S.; SOUSA, J. R. Avaliação do crescimento celular de leveduras em suco de caju. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Fortaleza. 2000. **Resumos....** Fortaleza: SBCTA, v. 3, n. 9, p. 60, 2000.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantitie of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BRASIL. Instrução normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de caju com alto teor de polpa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2000.

CHAGAS, C. M. A.; HONORATO, T. L.; PINTO, G. A. S.; MAIA, G. A.; RODRIGUES, S. Dextranucrase production using cashew apple juice as substrate: effect of phosphate and yeast extract addition. **Bioprocessa Biosyst Eng**, v. 30, p. 207 – 215, 2007.

COGAN, T. M.; JORDAN, K. N. Symposium : The dairy Leuconostoc. Metabolism of Leuconostoc bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2704 - 2707, 1994.

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

DWUIVEDI, B. K. **Low calorie and special dietary foods**. West Palm Beach: CRC Press, Inc, 1978, p.

DOLS, M.; CHRABI, W.; REMAUND-SIMEON, M.; LINDLEY, N. D.; MONSAN, P. F. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences on dextranucrase production. *Applied Environmental Microbiol*, v. 63, p. 2159 – 2165, 1998.

ERTEN, H. Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 735 – 739, 1998.

FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C.; HEMME, D. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 467 – 494, 2004.

GALVÃO, A. M. P. **Aproveitamento da fibra de caju (*Anacardium occidentale* L.) na formulação de um produto tipo hambúrguer.** 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

GAO, M.T.; HIRATA, M.; KOIDE, M.; TAKANASHI, H.; HANO, T. Production of v-lactic acid by eletrodialysis fermentation (EDF). **Process Biochemistry**, v. 39, p.1903 -1907, 2004.

GAO, M. T.; HIRATA, M.; TOORISAKA, E.; HANO, T. Study on acid-hydrolysis of spent cell for lactic acid fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 87 - 91, 2006.

GÖKSUMGUR, Y.; GÜVENÇ, U. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *Chemical Technology Biotechnology*, v. 69, p. 399 – 404, 1997.

GRIFFIN, W. C.; LYNCH, M. J. **Polyhydric alcohols.** In FURIA, T. E. (Ed.). *CRC Handbook of food additives*. 2. ed, v. 1. Cleveland, CRC-Press Inc., 1972, p. 431 – 455.

GROBBEN, G. J.; PETERS, S. W. P. G.; WISSELINK, H.; WEUSTHUIS, R. A.; HOEFNAGEL, M. H. N.; HUGENHOLTZ, J.; EGGINK, G. Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 6, p. 2867 – 2870, 2001.

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 Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 129 - 139, 1999.

HELANTO, M; AARNIKUNNA, J; VON WEYMARN, N; AIRAKSINEN, U; PALVA, A; LEISOLA, M. Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 283 – 294, 2005.

HIRATA, M.; GAO, M.T.; TOORISAKA, E.; TAKANASHI, F.; HANO, T. Production of lactic acid by continuos electrodiaslysis fermentation with a glucose concentration controller. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p.159 -163, 2005.

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. **World Journal Microbiol Biotechnol.** v. 23, p. 1409 – 1415, 2007.

IKAWA, T.T.; WATANABE, T.; NISIZAWA, K. Enzyme involved in the last steps of biosynthesis of mannitol in brown algae. **Plant Cell Physiol.** v. 13, p. 1017-1027, 1972.

ITOH, Y.; TANAKA, A.; ARAYA, H.; OGASAWARA, K.; INABI, H.; SAKAMOTO, Y.; KOGA, J. *Lactobacillus* B001 for the manufacture of mannitol, acetic acid, and lactic acid. *European patent EP 486024*, 20.5.1992.

KISHOR, C.; TRIVEDI U.; PATEL K. C. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design of lactic acid production by *Lactobacillus sp.* KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 98 – 103, 2007.

LI, X. Y.; GILMOUR, P. S.; DONALDSON, K.; MACNEE, W. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM-10) in vivo and in vitro. **Torax**, v. 31, p. 1216 - 1222, 1996.

LIMA, E. S.; SILVA, E. G.; MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) industrializado e cajuína, **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1143 -1146, 2007.

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

MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; GUIMARÃES, A. C. L. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 43-46, jan./abr. 2001. ISSN 0101-2061.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2 ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MENEZES, J.B.; ALVES, R.E. **Fisiologia e tecnologia pós colheita do pedúnculo do caju.** Fortaleza : EMBRAPACNPAT, 1995. 20p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 - 428, 1959.

NANCIB, N.; NANCIB, A.; BOUDJELAL, A.; BENSLIMANE, C.; BLANCHARD, F.; BOUDRNAT, J. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus*. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 149 –153, 2001.

NANCIB, A.; NANCIB, N.; CHERIF, M. D.; BOUBENDIR, A.; FICK, M.; BOUDRANT, J. Join effect of nitrogen source and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 63 – 67, 2005.

PETERSON, W. H., FRED, E. B. Fermentation of fructose by *Lactobacillus pentoaceticus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.41, p. 431 – 450, 1920.

PETINARI, R. A.; TARSITANO, M. A. A. Cashew (*Anacardium occidentale* L.) commercialization in northwest of São Paulo state. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 3, p. 697-699, dec. 2002. ISSN 0100-2945.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 98 - 103, 2006.

PRICE, R.L.; HOLANDA, L.L.F.; MOURA FÉ; J.A.; MAIA, G.A.; *et al.* Constituents of brazilian cashew apple juice. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.5, n.1-2, p.61-65,1975.

RABELO, C. M. **Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. 2008. 95 f.  
Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RICHTER, H.; HAMANN, I.; UNDEN, G. Use of the mannitol pathway in fructose fermentation of *Oenococcus oeni* due to limiting redox regeneration capacity of the ethanol pathway. **Arch. Microbiol**, v. 179, p. 227–233, 2003a

RICHTER, H.; DE GRAAF A. A.; HAMANN, I.; UNDEN, G. Significance of phosphoglucose isomerase for the shift between heterolactic and mannitol fermentation of fructose by *Oenococcus oeni*. **Arch. Microbiol**, v. 180, p. 370–465, 2003b

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. Effect of phosphate concentration on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 23, p. 57 – 62, 2003.

RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor**. 2003. 250 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SAHA, B. C., NAKAMURA, L. K.; Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 864 - 871, 2003.

SAHA, B. C., Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 991 - 995, 2006.

SAHA, B. C., RACINE, F. M., Production of mannitol by *Lactobacillus intermedius* NRRLB-3693 in fed-batch and continuous cell-recycle fermentations, **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1609 – 1613, 2007.

SALOU, P.; LOUBIERE, P.; PAREILLEUX, A. Growth and energetic of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose and fructose. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, p. 1459 – 1466, 1994.

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

SANTOS, M.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, A. Production of dextrasucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 177 - 188, 2000.

SANTOS, P. R.; SANTIAGO, A. A. X.; GADELHA, C. A. A.; CAJAZEIRAS, J. B.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; SANTOS, P. R.; 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.

SCHIWECK, H.; BÄR, A.; VOGEL, R.; SCHWARZ, E; KUNZ, M. **Sugar alcohols**. In ELVERS, B.; HAWKINS, S.; RUSSEY, W. (Ed.). *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry.*, 5 ed, v. A 25. Weinheim: VCH, 1994, p. 413-437.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer . **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 135 - 143, mai./ago. 2001.

SOARES, J. B. **O Caju: Aspectos Tecnológicos**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 1986, 256 p.

SOETAERT, W.; Production of mannitol with *Leuconostoc mesenteroides*. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent, v. 5514, p. 1549-1552, 1990.

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, 2002, Belém. **Resumos...** Belém: SBCTA, 2002. p. 158.

TONG, W.Y., FU X.Y., LEE S.M., TU J., LUI J.W, WEI D.Z *et al.* Purification of L(+) lactic acid from fermentation broth with paper sludge as cellulosic feedstock using weak acid anion exchange Amberlite IRA-92. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 89-96, 2004.

T. ZAUNMÜLLER , T.; EICHER, M.; RICHTER, H.; UNDEN, G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p. 421 – 429, 2006.

VERGARA, C. M. A. C. **Obtenção de oligossacarídeos prebióticos por processo fermentativo a partir do suco de caju clarificado *in natura***. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

WEYMARN, F. N. **Process development for mannitol production by lactic acid bacteria** . 2002. 114f.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia) – Departamento de Tecnologia Química, Universidade de Helsinki, Espoo, 2002.

WEYMARN, F. N.; KIVIHARJU, K.; JÄÄSKELÄINEN, T.; LEISOLA, M. S. A. Scale-up of a new bacterial mannitol production process. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 815 - 821, 2003

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

XU, G. O.; JU CHU, ZHUANG, Y. P.; WANG, Y. H.; ZHANG, S. L. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 189 – 197, 2008.

YU, L.; LEI, T.; REN, X.; PEI, X.; FENG, Y. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochemical Engineering Journal**, 2007, in press, doi: 10.1016/j.bej.2007.11.008

YUN, J.W., LEE, M. G., AAND SONG, S. K.; Batch production of high-content fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of B-fructofuranosidase and glucose oxidase. **J.Ferment. Bioeng.**, v. 77, p. 159 – 163, 1994.

YUN, J.W.; KANG, S.C.; SONG, S.K. Microbia l transformation of fructose to mannitol by *Lactobacillus* sp. KY-107. **Biotechnol Letters**, v. 18, p. 35 - 40, 1996.

YUN, J. W.; Kin, D. H. A comparative study of mannitol production by two lactic acid bacteria. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, p. 203 -208, 1998.