



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

MARIANA SANTIAGO SILVEIRA

**UTILIZAÇÃO DO SUCO DE CAJU CLARIFICADO PARA PRODUÇÃO
DE ÁCIDO LÁTICO PELO *LACTOBACILLUS CASEI* B-442.**

FORTALEZA- CEARÁ
2009

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

MARIANA SANTIAGO SILVEIRA

**UTILIZAÇÃO DO SUCO DE CAJU CLARIFICADO PARA PRODUÇÃO
DE ÁCIDO LÁTICO PELO *LACTOBACILLUS CASEI* B-442.**

FORTALEZA

2009

MARIANA SANTIAGO SILVEIRA

**UTILIZAÇÃO DO SUCO DE CAJU CLARIFICADO PARA PRODUÇÃO
DE ÁCIDO LÁTICO PELO *LACTOBACILLUS CASEI* B-442.**

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 título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA
2009

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 título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

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

Aprovada: ____/____/____

Mariana Santiago Silveira

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira
Universidade Federal do Ceará - UFC

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Ronaldo e Gláucia,
amores da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ronaldo e Gláucia, por todo amor, carinho, cuidado, apoio, incentivo e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã, Clarice, por todo amor, companheirismo e compreensão ao longo desta jornada.

A toda minha família materna e paterna. Todos os tios, tias, avós, primos e primas são muito queridos e muito especiais, importantes e presentes em minha vida. Levo um pouco de cada um em mim e para sempre.

À todos os meus queridos amigos, que tornam minha vida ainda mais bonita e mais feliz e por todos os momentos compartilhados de alegria e descontração.

À minha orientadora, Professora Sueli, por todo apoio, oportunidade e ensinamentos, pelo exemplo de ética, profissionalismo, dedicação, amor e excelência em tudo que se destina a fazer.

Aos meus queridos e especiais amigos, Cláudia e Alexandre, pela amizade e ótima parceria tanto no trabalho com na vida. Vou levar vocês dentro do coração para sempre.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) da Universidade Federal do Ceará, Claudinha, Alexandre, Cristiane, Carol, Jamile, Jonas, Imilena, Mauro, Soraya, Anaísa, Simone, Mayra, Luis, Jéssica e Tathiane, pelo excelente clima de convivência, pelo carinho, cuidado e amizade de todos.

Às minha amigas do curso de mestrado em especial, Edivânia, Ana Maria, Tânia, Sandra, Lívia, Patrícia, pela amizade, carinho e excelentes momentos compartilhados.

Às Professoras.Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira e.Dra. Gorete Ribeiro de Macedo que gentilmente aceitaram participar desta banca de defesa de dissertação contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial ao secretário Paulo Mendes, pela sua presteza no decorrer do curso.

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

O ácido láctico é um ácido orgânico que pode ser produzido por síntese química ou por fermentação. É um produto químico valioso e versátil apresentando inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e química. Existe como dois isômeros ópticos, D- ácido láctico e L- ácido láctico. Ambas as formas de isômeros de ácido láctico podem ser polimerizadas e polímeros com diferentes propriedades podem ser produzidos dependendo da composição. Dentre as bactérias lácticas, destaca-se o *Lactobacillus casei*, que produz um isômero opticamente puro (L-ácido láctico). A utilização de substratos agrícolas em processos fermentativos, tais como o pedúnculo do caju, tem se apresentado como uma alternativa eficiente para redução de custos. Neste estudo o suco de caju se mostrou favorável ao crescimento do *Lactobacillus casei* B-442, pois o suco é rico em glicose e frutose, é uma fonte rica de vitaminas do complexo B, além de possuir quantidades significativas de sais minerais como ferro, cálcio e fósforo, componentes estes que são muito importantes para o crescimento de bactérias lácticas como o *Lactobacillus casei* B-442, que necessita de um meio rico nutricionalmente para seu desenvolvimento. Este trabalho visou a otimização meio contendo suco de caju clarificado como substrato para o crescimento e produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* NRRL B-442, com a utilização do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, em substituição ao extrato de levedura, que é uma fonte de nitrogênio tradicionalmente utilizada em processos fermentativos, porém possui um custo bem elevado, quando comparado com o sulfato de amônio, que é seis vezes mais econômico. Para isso foi realizado um planejamento experimental variando as concentrações de açúcares redutores (25 a 50 g/L) e sulfato de amônio (0 a 12 g/L). Concentrações intermediárias de sulfato de amônio (6 g/L) e a concentração máxima de açúcares redutores (50 g/L) apresentaram maior produtividade (2,46 g/L.h) e elevado rendimento (91,43%). Foi realizado também um estudo cinético com açúcares redutores variando de 20 a 60 g/L e a concentração de sulfato de amônio obedeceu a proporção do primeiro planejamento. A temperatura foi controlada a 37°C e o pH a 6,5 (condições ótimas para o crescimento e produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442) em todas as condições do estudo cinético. Os melhores resultados em produtividade máxima, 3,10 g/L.h após 14 horas de fermentação, e rendimento de 100% foram encontrados com o meio contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio. Um outro estudo cinético foi realizado com meio sintético e com o suco de caju, ambos com a concentração de 50 g/L e suplementados com o extrato de levedura. O meio sintético apresentou melhores resultados quando comparados aos demais estudos, com produtividade máxima de 3,50 g/L.h após 13 horas de fermentação, porém o meio a base de suco de caju contendo 50g/L de açúcares redutores suplementado com sulfato de amônio apresentou resultados semelhantes com a vantagem de apresentar baixo custo. A utilização do suco de caju clarificado mostrou-se economicamente viável e favorável ao crescimento e produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442.

Palavras-chaves: Suco de caju clarificado, *Lactobacillus casei* B-442, estudo cinético, sulfato de amônio, ácido láctico e processo fermentativo.

ABSTRACT

The lactic acid is an organic acid that can be produced by chemical synthesis or fermentation. It is a versatile chemical with numerous applications in food, pharmaceutical and chemical industries. Lactic acid presents two isomers, D-lactic acid and L-lactic acid. Both isomers can be polymerized and polymers with different properties can be produced depending on the composition and proportion of each isomer. *Lactobacillus casei* is a lactic acid bacteria that produces an optically pure isomer (L-lactic acid), which may be used for food additive production. The use of agricultural substrate in fermentative processes, such as the cashew apple juice, showed an efficient alternative to reduce costs and support the growth of *Lactobacillus casei* B-442 because clarified cashew juice is rich in glucose and fructose, is a rich source of B complex vitamins, and present significant amounts of minerals like iron, calcium and phosphorus, components which are very important for the growth of lactic acid bacteria such as *Lactobacillus casei* B-442, since these microorganisms need a nutritionally rich medium for their development. This work aimed to optimize a culture medium, composed of clarified cashew juice, for growth and production of lactic acid by *Lactobacillus casei* NRRL B-442 using ammonium sulfate as nitrogen source in replacement of yeast extract, the nitrogen source traditionally used in fermentative processes with higher cost when compared to the ammonium sulfate (six times more economical). An experimental design changing the concentrations of reducing sugars (25 to 50 g/L) and ammonium sulfate (0 to 12 g/L) was carried out. Intermediate concentrations of ammonium sulfate (6 g/L) and maximum concentration of sugars (50 g/L) presented the higher productivity (2.46 g /L. h) with high yield (91.43%). A kinetic study with reducing sugars ranging from 20 to 60 g/L and the concentration of ammonium sulfate at the best proportion of the first experiment (6 g/L of ammonium sulfate and 50 g/L of reducing sugars) was also carried out. The temperature was controlled at 37°C and pH at 6.5 (optimum conditions for growth and production of lactic acid by *Lactobacillus casei* B-442). The best result for maximum productivity (3.10 g /L.h), after 14 hours of fermentation, with an yield of 100% was found with a culture medium containing 50 g/L of reducing sugar and 6 g/L of ammonium sulfate. Another kinetic study was carried out using synthetic and cashew juice culture media, both with the concentration of 50 g/L and supplemented with yeast extract. The synthetic medium showed better results when compared to the other studies, with maximum yield of 3.50 g/L.h after 13 hours of fermentation. The medium containing 50g /L of reducing sugars, from cashew apple juice, supplemented with ammonium sulfate showed similar results with the advantage of presenting lower costs. The use of clarified cashew apple showed to be economical, feasible and favorable to growth and production of lactic acid by *Lactobacillus casei* B-442.

Keywords: Cashew apple juice clarified, *Lactobacillus casei* B-442, lactic acid, kinetic study, ammonium sulfate, fermentative process.

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Características físico- químicas do pedúnculo do caju.....	29
2	Composição do meio MRS (<i>Man Rogosa e Sharpe</i>).....	31
3	Planejamento experimental para otimização do meio de cultura para produção de ácido láctico pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a partir do suco de caju clarificado.....	34
4	Planejamento fatorial para otimização das variáveis pH e temperatura para produção do ácido láctico pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a partir do suco de caju clarificado.	36
5	Composição do meio sintético suplementado com sais minerais.....	37
6	Composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado.....	43
7	Planejamento experimental para otimização do meio de cultura usado na produção de ácido láctico a partir do suco de caju clarificado e resultados experimentais de biomassa e produção de ácido láctico pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442.....	44
8	Resultados de rendimento e produtividade de ácido láctico produzido pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a partir do suco de caju clarificado segundo o planejamento fatorial composto elaborado.....	45
9	Efeitos estimados para a produção de biomassa do <i>Lactobacillus casei</i> B-442 segundo o planejamento experimental elaborado.....	46
10	Análise de variância para a produção de biomassa segundo o planejamento experimental elaborado (Equação 1).....	46
11	Efeitos estimados para a produção de ácido láctico para o <i>Lactobacillus casei</i> B- 442 segundo o planejamento experimental elaborado.....	48
12	Análise de variância para a produção do ácido láctico segundo o planejamento fatorial composto elaborado (Equação 2).....	48
13	Resultados de biomassa, rendimento e produtividade em ácido láctico para o <i>Lactobacillus casei</i> B-442.....	50
14	Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442.....	53
15	Resultados do estudo cinético para rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	54
16	Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	56
17	Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	57

18	Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores e 4,8 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	59
19	Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado 40 g/L de açúcares redutores e 4,8 g/L de sulfato de amônio para cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	60
20	Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato do amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	62
21	Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	63
22	Resultados do o estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 2,4 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	65
23	Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 6 g/L para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	66
24	Resultado do estudo cinético realizado com o meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	69
25	Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	70
26	Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5.....	72
27	Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5. clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.....	73
28	Fatores de conversão para os estudos cinéticos realizados com os meios contendo suco de caju clarificado variando a concentração de açúcares redutores e suplementado com sulfato de amônio e os meios contendo suco de caju clarificado e sintético suplementado com extrato de levedura para cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e ph 6,5.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Formas isoméricas do ácido láctico	19
2	Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas homofermentativas.....	22
3	Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas heterofermentativas.....	23
4	Fermentador TECNAL, modelo TE-420.....	35
5	Fluxograma da metodologia dos estudos fermentativos realizados.....	38
6	Superfície de resposta obtida para a produção de biomassa do <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B- 442	47
7	Superfície de resposta para a produção de ácido láctico pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442	49
8	Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores inicial; 7,2 g/L de sulfato de amônio para cultivo de <i>Lactobacillus casei</i> B-422 a 37°C e pH 6,5	55
9	Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores inicial e 6 g/L de sulfato de amônio para cultivo do <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5	58
10	Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores inicial e 4,8 g/L de sulfato de amônio para o cultivo do <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5	61
11	Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores inicial e 3,6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo do <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5	64
12	Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores inicial e 2,4 g/L de sulfato de amônio para o cultivo do <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a 37°C e pH 6,5	67
13	Relação entre o açúcar consumido e o ácido láctico produzido pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442 a partir do meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.....	71
14	Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores inicial e 6 g/L de extrato de levedura a 37°C e pH 6,5	74

- 15 Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) para os meios contendo suco de caju clarificado com 60, 50, 40, 30 e 20 g/L de açúcares redutores, para o suco de caju clarificado 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura e meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura 76
- 16 Fator produção do produto pela biomassa produzida ($Y_{p/x}$) para os meios contendo suco de caju clarificado com 60, 50, 40, 30 e 20 g/L de açúcares redutores, para o suco de caju clarificado 50 g/L suplementado com extrato de levedura e meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura..... 77
- 17 Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) para os meios contendo suco de caju clarificado com 60, 50, 40, 30 e 20 g/L de açúcares redutores, para o suco de caju clarificado 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura e meio sintético contendo 50 g/L suplementado com extrato de levedura. 78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Ácido-Lático	18
2.1.1	Aplicações do ácido-lático	19
2.1.2	Produção tecnológica	20
2.1.2.1	Síntese química	20
2.1.2.2	Processo fermentativo	21
2.2	Bactérias lácticas.....	21
2.3	Parâmetros do processo fermentativo	23
2.3.1	Fontes de carbono.....	23
2.3.2	Fontes de nitrogênio	24
2.3.3	Efeitos da temperatura	25
2.3.4	Efeitos do pH	25
2.4	Produção de ácido-lático de matérias-primas renováveis.....	26
2.5	Caju	27
2.5.1	Composição química do pedúnculo de caju	28
2.5.2	Suco de caju	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Obtenção do microrganismo	31
3.2	Ativação do <i>Lactobacillus casei</i> B-442 liofilizado	31
3.3	Preparação da cultura estoque em glicerol	31
3.4	Preparo do inoculo.....	32
3.5	Obtenção do suco de caju.....	32
3.6	Caracterização físico-química do suco de caju clarificado	33
3.7	Otimização do meio de cultura para a produção de ácido láctico	33
3.8	Otimização das variáveis pH e temperatura para produção de ácido láctico pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442.....	35
3.9	Estudo cinético da produção de ácido láctico a partir do suco de caju clarificado pelo <i>Lactobacillus casei</i> B-442 variando concentrações de açúcares redutores inicial.....	36
3.10	Estudo cinético da produção de ácido láctico variando meios de cultura suplementado com extrato de levedura.....	37
3.11	Análises químicas e físico-químicas	38
3.11.1	pH	38
3.11.2	Determinação dos açúcares redutores do suco de caju clarificado	39
3.11.3	Determinação de proteínas	39
3.11.4	Composição mineral do suco de caju	40
3.11.5	Determinação de ácido láctico	40
3.11.6	Determinação do crescimento celular	40
3.12	Cálculo do rendimento e produtividade em ácido láctico.....	40
3.13	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	41
3.13.1	Velocidade específica de crescimento microbiano.....	41
3.13.2	Velocidade específica de consumo de substrato.....	41

3.13.3	Taxa específica de formação do produto.....	41
3.14	Fatores de conversão.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Caracterização físico-química do suco de caju clarificado	43
4.2	Otimização do meio de cultura para produção de ácido láctico.....	44
4.3	Otimização das variáveis pH e temperatura para produção de ácido láctico	50
4.4	Estudo cinético da produção da produção de ácido láctico variando a concentração de açúcares redutores	51
4.5	Estudo cinético utilizando o meio sintético e o suco de caju clarificado suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio	68
5	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

A preocupação atual para o desenvolvimento e a sustentabilidade do meio ambiente têm aumentado significativamente o interesse pela utilização dos recursos renováveis para processos fermentativos (HAHN – HÄGERDAL e HOFVENDAHL, 2000). Assim, torna-se necessário maximizar a eficiência e minimizar os custos do processo fermentativo, e os resíduos de produtos competem de maneira eficaz com as opções tradicionais. Atualmente a atenção está voltada para o potencial biotecnológico usando resíduos agroindustriais como, bagaço da cana-de-açúcar, bagaço da mandioca, melação de cana-de-açúcar, melação de beterraba, resíduo da maçã, resíduo do abacaxi entre outros, como matéria-prima para processos fermentativos, com vantagens de possuir menor custo, boa produtividade e ser ambientalmente corretos (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007).

O ácido lático é uma substância química versátil usada como acidulante e conservante em alimentos, nas indústrias farmacêuticas, têxtil, couro, química e para polimerização para ácido poli-lático biodegradável (PLA) (HAHN – HÄGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

Na indústria química, os polímeros de ácido lático são usados principalmente para fabricação de embalagens, possuindo uma vantagem importante por ser biodegradável. Depois de descartado o polímero desaparece em poucos dias sem deixar resíduos no meio ambiente, sendo ecologicamente correto e uma opção eficaz para substituição das embalagens plásticas de origem petroquímica, que levam centenas de anos para degradar-se no meio ambiente (TACHIBANA e SHINDO, 2004; IDRIS e SUZANA, 2006).

Na indústria de alimentos o ácido lático é muito usado como acidulante, agente antimicrobiano, adjuvante de sabor, solvente, estabilizador, emulsificador além de ser considerado seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA) (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2005; NAMPOOTHIRI, PANDEY e JOHN, 2006).

O ácido láctico existe como dois isômeros ópticos, D-ácido láctico e L-ácido láctico. Ambas as formas de isômeros de ácido láctico podem ser polimerizadas em produtos com diferentes propriedades (HAHN – HÄGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

O ácido láctico é um ácido orgânico de ocorrência natural e pode ser produzido por síntese química ou por fermentação. Das 80.000 toneladas de ácido láctico produzidos no mundo todo ano, cerca de 90% são produzidos por fermentação bacteriana e o restante é produzido por síntese química (HAHN – HÄGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

A síntese química do ácido láctico é baseada principalmente na hidrólise da lactonitrila por ácidos fortes, que fornece somente misturas racêmicas de D- e L- ácido láctico. A síntese química não é um processo tecnológico economicamente viável (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2006).

A produção por fermentação tem a vantagem de permitir a produção de somente um dos isômeros, ou seja, podendo-se obter um produto opticamente puro, enquanto que na produção sintética o resultado sempre será uma mistura racêmica de D e L-ácido láctico (HAHN – HÄGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

A utilização de excedentes de alimentos e da agroindústria tornou o processo mais efetivo e economicamente viável para produção de ácido láctico por via fermentativa. Os excedentes possuem boa quantidade de carboidratos que serão metabolizados pelos microrganismos para produção de ácido láctico. A rota biotecnológica possui diversas vantagens comparando-se com a síntese química como, baixo custo de substratos, produção a temperaturas mais baixas e conseqüentemente menor consumo de energia (TÉLLEZ - LUIS, MOLDES e VÁZQUEZ, 2001; JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2006). Neste contexto, o uso de matérias-primas regionais como substrato de baixo custo para o desenvolvimento de processos fermentativos é uma alternativa interessante.

O caju é composto pelo pedúnculo (pseudofruto) e pela castanha (fruto verdadeiro). O pedúnculo por sua vez é muito desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado à amêndoa da castanha, tipicamente um produto de exportação, enquanto os produtos obtidos a partir do processamento do pedúnculo destinam-se basicamente ao mercado interno (LEITE, 1994). Considerando-se que o pseudofruto (pedúnculo do caju)

corresponde a 90% da massa do caju, calcula-se que o país produza cerca de dois milhões de toneladas desse produto, no entanto, menos de 10% desse total é aproveitado industrialmente ou para consumo *in natura*, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento de castanha. O produto industrial mais significativo do pedúnculo é o suco de caju (PAIVA *et al.*, 2000, SANCHO, 2006). O suco de caju é rico em nutrientes e açúcares (glicose e frutose) e não requer nenhum tratamento prévio como hidrólise ou tratamento enzimático (HONORATO *et al.*, 2007). Sendo assim uma matéria-prima de baixo custo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido Láctico

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiacético, $C_3H_6O_3$) é um ácido orgânico de grande ocorrência na natureza (DATTA *et al.*, 1995; SRIVASTAVA, NARAYANAN E ROYCHOUDHURY, 2004; JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007). Foi descoberto e isolado em 1780 pelo Químico Sueco Carl Wilhem Scheele do leite azedo (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007). Foi o primeiro ácido orgânico a ser produzido comercialmente por fermentação no início de 1881. Está presente em muitos alimentos naturalmente ou como produto da fermentação microbiana, é também um dos principais metabólitos intermediários da maioria dos organismos vivos procariontes anaeróbios (DATTA *et al.*, 1995).

O ácido láctico é um produto químico de grande interesse industrial, valioso e versátil devido suas inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica e química (NANCIB *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2007; HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

O ácido láctico puro é um sólido branco cristalino com baixo ponto de fusão (53°C) e aparece geralmente na forma de solução aquosa levemente concentrada. Normalmente o ácido láctico apresenta-se como líquido de cor clara ou amarelada. Possui sabor azedo, é inodoro e solúvel em água, álcool e éter, mas insolúvel em clorofórmio. É um ácido muito corrosivo, portanto, deve-se usar material de alta resistência à corrosão, como por exemplo, o aço-inoxidável, cerâmica e vidro (RASHID, 2008).

Devido a presença de um átomo de carbono assimétrico, existem duas formas opticamente ativas com rotações opostas de luz polarizada L (+) e D (-) ácido láctico, como mostra a Figura 1.

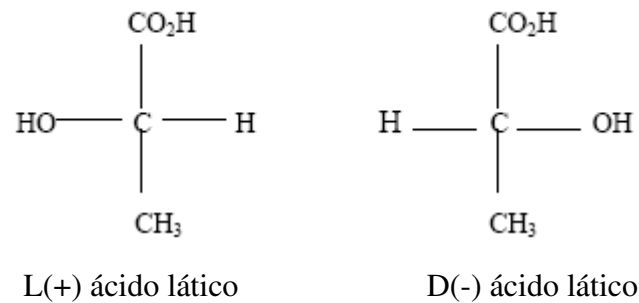


Figura 1: Formas isoméricas do ácido láctico.

O isômero L(+)
ácido láctico é preferido para aplicações farmacêuticas e de alimentos porque ele é um intermediário do metabolismo normal dos mamíferos, sendo, portanto, seguro para a saúde humana (ZHANG *et al.*, 2008). Já o D(-)
ácido láctico é considerado um isômero não fisiológico, podendo provocar efeitos adversos para os lactentes e doentes que sofrem da síndrome do intestino curto e de falência intestinal (AARNIKUNNAS, 2006; YU *et al.*, 2007), porém o isômero D-lactato pode ter outras aplicações, como por exemplo, na indústria química para produção de plásticos biodegradáveis (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000; JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007).

2.1.1 Aplicações do Ácido Láctico

O ácido láctico possui diversas aplicações nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica e química. Na indústria de alimentos é utilizado como agente antimicrobiano, adjuvante de sabor, solvente, estabilizador, umectante e emulsificador, além de ser reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA).

Na indústria de polímeros biodegradáveis é empregado como matéria-prima para produção de plásticos biodegradáveis a partir da polimerização do ácido-láctico a poli-ácido láctico ou poli-lactato. É utilizado para fabricação de embalagens, incluindo embalagens para alimentos (GAO *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2005, HIRATA e GAO, 2005; GAO *et al.*, 2004). A utilização do plástico biodegradável é uma alternativa viável e ambientalmente correta para substituição dos plásticos de origem petroquímica, que levam centenas de anos para se decompor no meio ambiente.

O ácido lático tem sido encontrado em aplicações na área biomédica, sendo utilizado em suturas cirúrgicas, próteses e sistemas de carreadores de drogas controladas em humanos (KISHOR *et al.*, 2005).

Nas indústrias farmacêuticas são muito usados na formulação de cosméticos. Ácido lático é um ácido alfa hidroxí (AHA) e é encontrado na pele, sendo usado como agente rejuvenescedor e regulador do pH. É um ingrediente comum em preparações anti-acne, agentes hidratantes, e em muitos produtos de cuidados da pele (RASHID, 2008). Outra aplicação do ácido lático e seus derivados, particularmente ésteres de lactato, é na fabricação de solventes verdes, que são chamados dessa forma pois são solventes que não são tóxicos, não deixam resíduos no meio ambiente sendo ambientalmente corretos (HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000). A taxa de consumo de ácido lático tem crescido em média em 15 % ao ano, e um mercado de aproximadamente 390 mil toneladas/ano foi projetado para 2008 (TONG *et al.*, 2004).

2.1.2 Produção Tecnológica

O ácido lático é um ácido orgânico de ocorrência natural que pode ser produzido por síntese química ou por processo fermentativo. No entanto é mais comumente produzido via processo biotecnológico através de matérias-primas renováveis.

2.1.2.1 Síntese Química

A fabricação sintética do ácido lático, em escala comercial, teve início por volta de 1963 no Japão e Estado Unidos (RASHID, 2008). A síntese química do ácido lático produz uma mistura racêmica de D e L ácido lático. O processo comercial para a síntese química é baseado na lactonitrila. Cianeto de hidrogênio é adicionado ao acetaldeído na presença de uma base para produzir lactonitrila. Esta reação ocorre na fase líquida em altas pressões atmosféricas. A lactonitrila bruta é recuperada e purificada por destilação. Em seguida é hidrolisada a ácido lático, usando ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou ácido clorídrico (HCl)

concentrado, produzindo sais de amônia e ácido láctico. Esta preparação bruta é esterificada com metanol para a produção de metil-lactato. O metil-lactato é recuperado, purificado por destilação e, em seguida, hidrolisado sob condições ácidas para produzir ácido láctico purificado. (SRIVASTAVA, NARAYANAN e ROYCHOUDHURY, 2004).

A síntese química produz apenas misturas racêmicas e D e L ácido láctico e apresenta alto custo de produção (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007 (SRIVASTAVA, NARAYANAN e ROYCHOUDHURY, 2004; HAHN-HAGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

2.1.2.2 Processo Fermentativo

O processo fermentativo é caracterizado por processos biológicos de degradação de substrato (glicose) por uma população de microorganismos (biomassa) em metabólitos, como o etanol, ácido cítrico e ácido láctico (MAHER *et al.*, 1995). O ácido láctico é produzido de hexoses via Embden Meyerhof-Parnas ou via glicolítica. O ácido pirúvico produzido é reduzido a ácido láctico pela enzima lactato desidrogenase.

A produção de ácido láctico via processo fermentativo tem como principal objetivo permitir um processo mais efetivo e econômico. A via biotecnológica oferece diversas vantagens comparada à síntese química, como por exemplo, produto com alta especificidade, como a produção do isômero desejado opticamente puro (D ou L-ácido láctico) e o uso de recursos renováveis como substrato na fermentação, além do baixo custo do processo. A produção de ácido láctico a partir da fermentação microbiana representa mais de 50 % da produção mundial (KISHOR *et al.*, 2005).

2.2 Bactérias Lácticas

As bactérias ácido lácticas possuem formato de cocos ou bastonetes, são incapazes de sintetizar o ATP por respiração, tem como principal produto final o ácido láctico proveniente da fermentação de açúcares. A maioria das bactérias lácticas são anaeróbias ou microaerófilas, utilizam o ácido pirúvico que é o produto final da via Embden Meyerhof para

conversão em lactato, são catalase negativa, imóveis e não formadoras de esporos. Possuem alta tolerância a ambientes ácidos e sobrevivem a pH 5 ou menos. Sua tolerância a acidez tornam-as competitivas em relação às outras bactérias. A temperatura ótima de crescimento varia de acordo com o gênero e está entre 20 a 45 ° C (HAHN – HÄGERDAL E HOFVENDAHL, 1999; JOHN, NAMPOOTHIRI E PANDEY, 2006).

As bactérias lácticas fermentam açúcares por vias diferentes podendo ser homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas produzem principalmente o ácido láctico do metabolismo de açúcares pela via glicolítica (Figura 2).

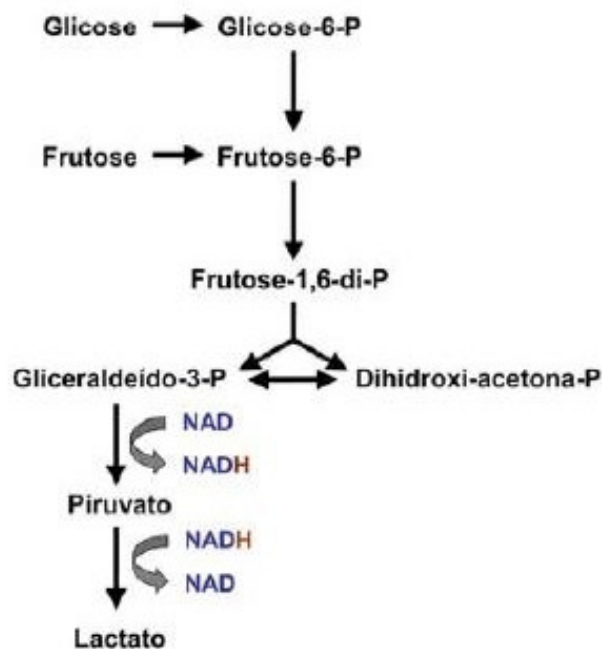


Figura 2: Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas homofermentativas.

As bactérias heterofermentativas (Figura 3) produzem quantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, etanol, diacetil e manitol de hexoses (COGAN e JORDAN, 1994). Utilizam a via fosfoaldolase ou via das pentoses para a fermentação das hexoses (WISSELINK *et al.*,2002)

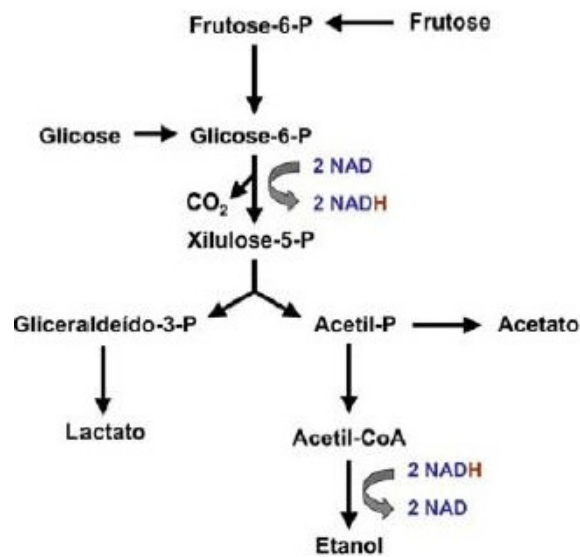


Figura 3: Metabolismo de hexoses para bactérias lácticas heterofermentativas.

Por outro lado, as bactérias lácticas homofermentativas produzem 2 mols de ácido láctico da fermentação de hexoses, inclusive frutose (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007).

As bactérias ácido lácticas possuem exigências nutricionais complexas, devido a sua habilidade limitada para sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos, requerendo desta maneira um meio rico nutricionalmente para seu crescimento (HAHN – HÄGERDAL e HOFVENDAHL, 2000; ZHANG *et al.*, 2008).

2.3 Parâmetros do processo fermentativo

2.3.1 Fontes de carbono

Um grande número de diferentes substratos têm sido usados para produção fermentativa de ácido láctico por bactérias lácticas. O mais puro produto é obtido quando um açúcar puro é utilizado para fermentação. Porém isto é economicamente desfavorável, porque os açúcares puros são muito caros e o ácido láctico é um produto relativamente barato. Portanto, ao invés de utilizar substratos de elevado valor econômico torna-se necessário e viável utilizar excedentes agro-industriais. Estes por sua vez, são ricos em carboidratos que poderão ser metabolizados pelos microrganismos. Dessa maneira diminui-se os custos

tornando o processo economicamente viável e contribui-se com o meio ambiente (HAHN – HÄGERDAL & HOFVENDAHL, 2000).

2.3.2 Fontes de nitrogênio e vitaminas

As bactérias lácticas são microrganismos muito exigentes nutricionalmente. Exigem um meio rico principalmente em fontes de nitrogênio, vitaminas e ácidos nucléicos devido sua capacidade limitada de sintetizar vitaminas do complexo B (HAHN- HAGERDAL E HOFVENDAHL, 2000; ZHANG *et al.*, 2008).

Um dos principais problemas na fermentação utilizando bactérias lácticas é a necessidade de assimilação de nitrogênio e suplementos de vitaminas para sustentar o crescimento. O extrato de levedura é uma fonte de nutriente 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 e GÜVENC, 1997; NANCIB *et al.*, 2005).

Entretanto, quando se pensa em um processo industrial o uso de extrato de levedura pode comprometer a viabilidade econômica do processo devido ao seu alto custo. Dessa forma, a substituição do extrato de levedura por fontes alternativas de nitrogênio mais econômicas têm sido alvo de diversos estudos. Nancib e colaboradores (2005) estudaram o efeito de diversas fontes de nitrogênio no processo fermentativo utilizando o suco de tâmara. Dentre todas as fontes estudadas os melhores resultados foram obtidos utilizando o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. O sulfato de amônio apresentou resultados bem semelhantes comparando-se com o extrato de levedura com uma vantagem de ser muito mais econômico (seis vezes mais barato).

Hujanen e Linko (1996) com o objetivo de diminuir os custos do processo usaram o extrato de levedura em combinação com o extrato de malte, dessa forma utilizaram uma quantidade menor de extrato de levedura (4 g/L) ao invés da quantidade adicionada quando o extrato de levedura era usado como única fonte de nitrogênio (22 g/L), obtendo bons resultados e diminuindo os custos de processo.

2.3.3 Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes no crescimento de microrganismos. A maioria das espécies possuem uma série de características em relação à temperatura em que podem crescer, elas não crescem numa mesma faixa de temperatura.

Crescimento microbiano é governado pela taxa da reação química catalisada por enzimas das células. As bactérias ácido lácticas são classificadas como termófilas ou bactérias mesófilas.

Idris e Suzana (2005) estudaram o efeito da temperatura na produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* no líquido do resíduo do abacaxi. O *Lactobacillus delbrueckii* é uma bactéria mesófila que cresce numa faixa de temperatura entre 17 – 50° C e tem um crescimento ótimo na faixa entre 20 a 40° C. O presente artigo relacionou a produção de ácido láctico em diferentes temperaturas, entre 27 a 50° C. A maior produção de ácido láctico foi obtida a 37° C. Numa temperatura superior a 37° C a produção de ácido láctico diminui. Os microrganismos foram menos capazes de metabolizar os açúcares a estas temperaturas (IDRIS e SUZANA, 2006).

Hujanen e Linko (1996) pesquisaram sobre o efeito da temperatura na produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-441. Testaram temperaturas que variaram de 30 a 45°C. A temperatura ótima encontrada foi de 37°C tanto para produção de ácido láctico quanto para resultados em produtividade máxima.

2.3.4 pH

O pH da fermentação é inicialmente fixo e logo depois há uma diminuição do valor devido à produção ácida. Isto pode ser controlado por adição de base, muitos pesquisadores utilizam carbonato de cálcio para controlar o pH do processo fermentativo (HAHN – HÄGERDAL e HOFVENDAHL, 2000).

As bactérias ácido lácticas crescem bem em ambientes neutros ou próximo a neutralidade, com pH inicial variando entre 5,5 – 7,5; mas o melhor pH inicial encontrado foi

6,5. Em ambientes que são muito ácidos e/ou muito alcalinos a produção de ácido láctico é nula ou mínima (AXELSSON, 2004).

Vários pesquisadores estudaram o pH ótimo para maior produtividade e rendimento de ácido láctico por bactérias lácticas e foi encontrado na maioria das pesquisas o valor 6,5 ou em torno deste como pH ótimo de crescimento e produção de ácido láctico (IDRIS e SUZANA, 2006; HUJANEM *et al.*, 2001; SENTHURAN *et al.*, 1999; HUJANEM e LINKO, 1996).

2.4 Produção de ácido láctico de matérias-primas renováveis

Os resíduos de colheitas ou resíduos agro-industriais são fontes renováveis de energia. São produzidos aproximadamente 3,5 bilhões de toneladas por ano de resíduos agrícolas no mundo. O uso do carboidrato específico de matérias-primas renováveis depende do preço, disponibilidade e pureza. Embora os resíduos agro-industriais sejam ricos em carboidratos, a utilização destes está limitada devido ao baixo conteúdo de proteína e pobre digestibilidade (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007).

A fonte de carbono para produção microbiana de ácido láctico pode ser qualquer açúcar em forma pura como glicose, sacarose, lactose etc. ou açúcares de materiais como melaços, soro de queijo, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de mandioca, e materiais amiláceos de batata, tapioca, trigo, cevada, e cenoura. A economia da produção de ácido láctico e seus derivados depende de muitos fatores no qual o custo da matéria-prima é o fator mais significativa (JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDEY, 2007).

O melaço da cana-de-açúcar foi relatado sendo usado como substrato para produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em fermentação descontínua suplementado com extrato de levedura e peptona como fonte de carbono e nitrogênio (HAULY *et al.*, 2003).

O melaço da beterraba foi usado como meio de produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* (HOTZAMANIDIS, SKARACIS e ROUKAS, 2002).

Nampoothiri, Jonh e Pandey (2006) aproveitaram dois resíduos agroindustriais, bagaço da mandioca e o bagaço da cana-de-açúcar, como meio de baixo custo para produção de ácido-lático por *Lactobacillus delbrueckii* em fermentação em estado sólido (SSF). O bagaço da mandioca gelatinizado foi hidrolisado enzimaticamente e o amido hidrolisado foi usado para umedecer o bagaço da cana-de-açúcar, o qual foi usado como meio para fermentação. Este substrato foi suplementado com cloreto de amônio e extrato de levedura.

Outro meio de baixo custo utilizado para aumentar a economia foi o xarope de milho (CSL) para produção de ácido lático por *Lactobacillus coryniformis*, (BUSTOS *et al.*, 2004) e por *Lactobacillus delbrueckii* (TÉLLEZ – LUIS *et al.*, 2003). Foi relatada por Nancib *et al.*, (2005) a produção de ácido lático por *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* em suco de tâmara suplementado com várias fontes de nitrogênio (extrato de levedura, sulfato de amônio, tripticase de soja, uréia e caseína hidrolisada) e vitaminas do complexo B (ácido fólico, riboflavina, niacina, ácido pantatênico e piridoxina).

Idris e Suzana (2005) relataram a produção de ácido lático no líquido do resíduo do abacaxi utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio de *Lactobacillus delbrueckii* em fermentação em batelada. Tachibana e Shindo (2004) utilizaram grãos gastos, que são resíduos da indústria cervejeira, para produção de ácido lático utilizando o *Lactobacillus rhamnosus* NBRC3532 e NBRC14710 e o *Lactobacillus vaccinosteraus* JCM1716. Grãos usados foram liquidificados por tratamento de explosão de vapor para obtenção de açúcar de forma disponível para serem metabolizados por microrganismos.

2.5 Caju

O cajueiro pertence à família *Anacardiaceae*, gênero *Anacardium L.*, espécie *Anacardium occidentale L.* 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 a única espécie do gênero que é cultivada com finalidade comercial, enquanto que as demais espécies são exploradas apenas por extrativismo (SANCHO, 2006).

A cajucultura é uma atividade econômica e social de grande expressão para o Nordeste brasileiro, sendo cultivado principalmente nos estados do Ceará (68%), Rio Grande do Norte (11%) e Piauí (8%) (MAIA *et al.*, 2001), garantindo renda para mais de 150 mil pessoas no Estado do Ceará, e gerando divisas superiores a 140 milhões de dólares anuais (MAIA *et al.*, 2004). Mais de 98% da área ocupada com cajueiro no Brasil se encontra na região Nordeste.

O fruto do cajueiro, denominado caju, é composto pela castanha, que é considerado o fruto verdadeiro, e o pseudofruto ou pedúnculo. A castanha 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 de LCC (líquido da casca da castanha). Desenvolve-se por seis a oito semanas após a polinização, com o pedúnculo desenvolvendo-se mais intensamente durante as duas últimas semanas. O fruto e o pedúnculo caem juntos, e espontaneamente, após sete ou oito semanas (MENEZES e ALVES, 1995).

O verdadeiro fruto do cajueiro (castanha de caju) é que apresenta grande valor comercial tanto no Brasil como no exterior, desta forma, o pseudofruto ou pedúnculo acaba por ser sub-utilizado. Este, que corresponde cerca de 90% do peso do caju, representa uma quantidade enorme de matéria-prima perdida anualmente (SANCHO, 2006). Calcula-se que o país produza cerca de dois milhões de toneladas desse produto, no entanto, menos de 10% desse total é aproveitado industrialmente ou para consumo *in natura*, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento de castanha. O produto industrial mais significativo do pedúnculo é o suco de caju (SANCHO, 2006).

2.5.1 Composição Química do Pedúnculo do Caju

O caju é considerado uma ótima fonte de vitamina C e boa fonte de vitaminas do complexo B, como riboflavina e tiamina (SANCHO, 2006). O pedúnculo do caju possui uma composição bastante complexa sendo uma fonte rica em vitaminas e sais minerais, possuindo cerca de 156 mg a 387 mg de vitamina C, carboidratos além de minerais como cálcio, ferro e fósforo, tornando-o matéria-prima adequada para o desenvolvimento de produtos alimentícios diversos, contribuindo na melhoria da saúde e bem-estar da população. Por outro lado a

composição do pedúnculo é responsável pela sua alta perecibilidade, exigindo cuidados especiais para estocagem, transporte, limpeza e processamento (RABELO, 2008).

A composição físico-química do pedúnculo do caju varia largamente em função, dentre outras, da variedade, estágio de maturação, tamanho, duração da colheita e variações ambientais regionais (SOUZA, 2002). A Tabela 1 apresenta as características químicas e físico-químicas do pedúnculo de caju.

Tabela 1. Características físico-químicas do pedúnculo do caju.

Determinações	Valores médios
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 ₂ O ₅) (mg/100g)	32,55
Umidade (%)	86,33
pH	3,90

FONTE: SOARES (1986).

Além de ser uma rica fonte de vitaminas, como vitamina C e vitaminas do complexo B, como riboflavina e tiamina, 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).

2.5.2 Suco de Caju

De acordo com a legislação brasileira o suco de caju clarificado é definido como uma bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju, através de processo tecnológico adequado. O suco deve apresentar características de sabor próprio, levemente ácido ou adstringente e odor próprios e a coloração variando da cor branca á amarelada (BRASIL, 2000).

O suco de caju é uma complexa mistura de vitaminas, polifenóis, açúcar, sais minerais, ácido orgânicos, aminoácidos, além de ser uma excelente fonte de vitamina C, contendo aproximadamente seis vezes mais do que o suco de laranja (AZOUBEL *et al.*, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do microrganismo

Foi utilizada a cultura liofilizada de *Lactobacillus casei* NRRL B- 442 obtidos da ARS Culture Collection (Peoria Illinois –USA).

3.2 Ativação do microrganismo

A cultura liofilizada de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 foi transferida para um tubo de ensaio contendo 8 mL de caldo MRS (*Man, Rogosa e Sharpe*), previamente esterilizado à temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Em seguida, foram transferidas alíquotas deste tubo para quatro erlenmeyers contendo 50 mL de caldo MRS cada. Os mesmos foram incubados à temperatura de 37°C, em estufa B.O.D., durante 16 horas.

Tabela 2: Composição do meio MRS (*Man, Rogosa e Sharpe*).

Reagente	Concentração (g/L)
Peptona Protease	10
Extrato de Carne	10
Extrato de Levedura	5
Dextrose	20
Poli Sorbato 80	1
Citrato de Amônio	2
Acetato de Sódio	5
Sulfato de Magnésio	0,1
Sulfato de Manganês	0,05
Fosfato Dipotássio	2

pH 6,5 ± 0,2

3.3 Preparação de cultura-estoque em glicerol

Para a elaboração das culturas-estoque de *Lactobacillus casei*, foram separados dez tubos de ensaio estéreis e, em seguida, foi acrescentado, a cada um deles, 2,5 mL de glicerol estéril e 2,5 mL de meio MRS fermentado (descrito no item anterior). As culturas-

estoques foram armazenadas em *freezer*, à temperatura de -20 °C. O procedimento foi baseado nos escritos de WILSON e HORNE (1982).

3.4 Preparo do Inóculo

O inóculo foi feito a partir de um tubo de cultura estoque em glicerol do *Lactobacillus casei* B-442 transferida para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio MRS esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Depois de transferir um tubo contendo 10 mL de cultura estoque em glicerol em câmara de fluxo foi adicionado 10 mL de uma solução tampão de fosfato bibásico de potássio (200 g/L; pH 6,5) para manter o pH a 6,5 por um tempo maior. Após esse procedimento o erlenmeyer contendo o meio MRS adicionados da cultura estoque e do tampão fosfato, foi incubado numa estufa bacteriológica à 37°C durante 16 horas. Logo após as 16 horas foi feita a leitura em espectrofotômetro a 590 nm e o pH do inóculo 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 norma AOAC (1992).

3.5. Obtenção do suco de caju

O suco de caju clarificado utilizado foi obtido junta à Embrapa Agroindústria Tropical a partir da prensagem mecânica do pedúnculo do caju seguida da clarificação. O processo de clarificação do suco consistiu na adição de gelatina para decantação de sólidos totais e taninos (ABREU, 2006). Neste processo, sobre 50 mL de suco de caju, resultante da centrifugação da polpa, foram adicionados 5,0 mL de solução de gelatina 1% (p/v). Após 40 minutos as suspensões foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 42 (COURI *et al.*, 2002).

O suco de caju clarificado *in natura* é altamente perecível e foi estocado congelado a uma temperatura de -20°C para evitar deterioração, uma vez que não foram utilizados aditivos por se tratar de uma matéria-prima para uso em processos fermentativos.

3.6 Caracterização físico – química do suco de caju clarificado

O suco de caju foi físico – quimicamente caracterizado quanto ao pH por potenciometria direta, açúcares redutores pelo método DNS (MILLER, 1959), proteínas segundo Bradford (1976) e composição mineral (sódio, potássio, fosforo, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, zinco e manganês) segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

Como a concentração de açúcares redutores do suco de caju é em torno de 65 g/L, realizou-se diluições para as concentrações trabalhadas de 20, 30, 37,5, 40, 50 e 60 g/L.

3.7 Otimização do meio de cultura para produção de ácido láctico

Para o estudo da produção do ácido láctico pelo *Lactobacillus casei B-442* utilizando como substrato o suco de caju clarificado foi realizada a otimização da composição do meio variando as concentrações de açúcar redutor(25, 37,5 e 50 g/L) e sulfato de amônio (0, 6 e 12 g/L) através do planejamento experimental compositivo central. A Tabela 2 apresenta o planejamento experimental para o *Lactobacillus casei B-442* variando açúcares redutores e sulfato de amônio. Este estudo foi conduzido em fermentador de marca TECNAL modelo TE-420 A capacidade da dorna do fermentador é de 1 litro e o volume trabalhado foi de 500 mL.

Tabela 3. Planejamento experimental para otimização do meio de cultura para produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442 a partir do suco de caju clarificado.

Pontos	Açúcar Redutor (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)
1	25	0
2	25	12
3	50	0
4	50	12
5	25	6
6	50	6
7	37,5	0
8	37,5	12
9	37,5	6
10	37,5	6
11	37,5	6

O pH inicial de todos os meios foi ajustado para 6,5 e em seguida os mesmos foram esterilizados a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos. O microrganismo ativado em caldo MRS foi inoculado no fermentador (Figura 2) a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura. O volume do meio de cultura trabalhado foi de 500 mL e o volume do inóculo foi de 50 mL correspondendo a uma concentração celular de 1,58 g/L. Esta concentração foi a mesma para todos os pontos do planejamento experimental. A temperatura foi ajustada e mantida a 37 °C (temperatura ótima de crescimento do microrganismo *Lactobacillus casei* sp) e o pH do meio durante a fermentação foi controlado a 6,5 por adição de hidróxido de sódio 3 N.



Figura. 4 Fermentador TECNAL, modelo TE-420.

3.8 Otimização das variáveis pH e temperatura para produção de ácido lático.

Nesta etapa foi realizado um planejamento experimental fatorial utilizando o melhor ponto do planejamento experimental anterior (item 3.6), correspondente ao ponto número 6 que continha 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio. As temperaturas investigadas foram de 29 a 45°C e o pH de 6,0 a 7,0. A Tabela 3 apresenta o planejamento fatorial para o estudo do pH e temperatura de cultivo do *Lactobacillus casei* B-442. Os ensaios foram conduzidos em fermentador, o pH foi controlado no valor desejado através da adição de NaOH 3 N.

Tabela 4. Planejamento fatorial para otimização das variáveis pH e temperatura para produção do ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442 a partir do suco de caju clarificado.

Pontos	pH	Temperatura(°C)
1	6	29
2	7	29
3	6	45
4	7	45
5	6,5	37
6	6,5	37
7	6,5	37

3.9 Estudo cinético da produção de ácido láctico a partir do suco de caju clarificado pelo *Lactobacillus casei* B-442 variando concentrações de açúcares redutores inicial.

Otimizada a composição do meio de cultura em açúcares redutores e sulfato de amônio, realizou-se um estudo cinético para analisar as melhores condições de realização da fermentação para produção do ácido láctico.

A partir dos dados obtidos na otimização do meio de cultura, foi realizada a fermentação do suco de caju com o microrganismo *Lactobacillus casei* B-442 para a produção do ácido láctico.

O suco de caju utilizado para a fermentação foi preparado por diluição do suco de caju clarificado para atingir a quantidade de açúcar redutor desejada e complementado com sulfato de amônio.

Em seguida, o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5. O valor de pH 6,5 e temperatura 37°C têm sido reportados por diversos autores como as melhores condições para o crescimento do microrganismo e produção de ácido láctico. O microrganismo ativado no meio MRS foi inoculado a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura. A fermentação foi conduzida em Fermentador TECNAL, modelo TE-420 a 37°C com agitação de 150 rpm.

3.10 Estudo cinético da produção de ácido lático variando meios de cultura suplementado com extrato de levedura

Foi realizado um novo estudo cinético utilizando o meio sintético (Tabela 5) suplementado com sais minerais e como fonte de nitrogênio foi usado o extrato de levedura e o suco de caju clarificado suplementado com o extrato de levedura. Para o meio sintético e para o meio contendo suco de caju clarificado foi utilizada uma concentração de 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura. Este estudo cinético teve como objetivo comparar a fonte de nitrogênio utilizada nos ensaios do estudo cinético anterior (sulfato de amônio) com o extrato de levedura, fonte de nitrogênio mais comumente utilizada e de maior custo e traçar um paralelo entre as duas fontes utilizadas como também comparar o meio sintético composto por glicose e frutose suplementado de sais minerais com o meio contendo suco de caju clarificado. As condições do estudo cinético realizado foram as mesmas do o estudo cinético anterior, ou seja, temperatura a 37 °C, pH controlado para 6,5 através do hidróxido de sódio 3 N e rotação de 150 rpm. O volume do meio fermentado foi de 500 mL e a concentração celular inicial foi de 1,58 g/L .

Tabela 5. Composição do meio sintético suplementado com sais minerais.

Reagente	Concentração(g/L)
Frutose	25
Glicose	25
Fosfato de potássio dibásico	20
Sulfato de magnésio	0,2
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,01
Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01

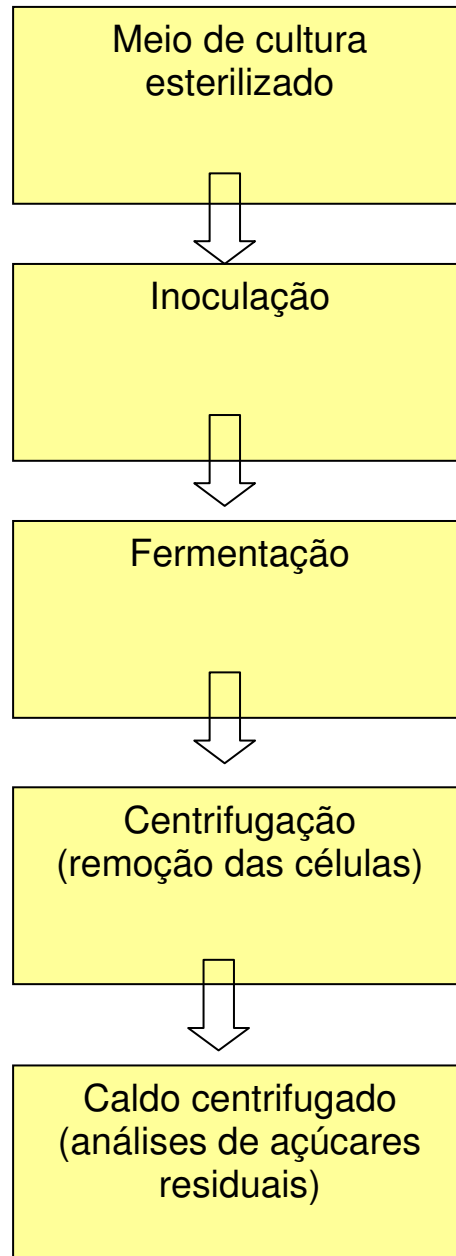


Figura 5: Fluxograma da metodologia dos estudos fermentativos realizados

3.11 Análises químicas e físico-químicas

3.11.1 pH

O pH do suco de caju clarificado 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 norma AOAC (1992).

3.11.2 Determinação dos açúcares redutores do suco de caju clarificado

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método do DNS (MILLER, 1959), que é uma técnica para quantificação de açúcares redutores que consiste na reação da amostra com reagente 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 desta curva de calibração foram adicionados 125µL de cada solução padrão em um tubo de ensaio com tampa 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 . O mesmo procedimento foi realizado para determinação de açúcares nas amostras as quais foram previamente diluídas.

3.11.3 Determinação de proteínas

Para determinação da massa protéica 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 (m/v), a qual foi posteriormente filtrada em papel de filtro Whatman nº 1. A partir dessa solução foi preparada uma curva padrão com albumina bovina (BSA) em concentrações conhecidas (faixa de 10 a 200 µg/mL). Foram adicionados 50µL de cada solução estoque, 700µl de H₂O destilada e 750 µl do Coomassie a tubos de ensaio, os quais foram agitados imediatamente após a adição dos reagentes. Após 5 minutos, a leitura da absorbância em 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.

3.11.4 Composição mineral do suco de caju

A composição mineral do suco de caju foi avaliada através da determinação dos teores 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 por 24 horas com mistura ácida nitro-perclórica na proporção de 3:1 (600 mL de HNO₃ 65% p.a e 200 mL de HClO₄ 72%). A quantificação de sódio e potássio foi realizada por fotometria de emissão de chamas em um equipamento DIGIMED modelo DM-61, enquanto os demais minerais foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica em equipamento Perkin-Elmer, modelo A-Analyst 300 (MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA, 1997).

3.11.5 Determinação de ácido láctico

O ácido láctico foi calculado por balanço estequiométrico considerando o volume de NaOH 3 N adicionado ao meio para manter o pH no valor desejado. Considera-se para o cálculo que um mol de NaOH neutraliza um mol de ácido láctico.

3.11.6 Determinação do crescimento celular

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, realizou-se a leitura da absorbância contra um branco com água. A concentração de biomassa foi calculada através de uma curva de calibração construída a partir da determinação do peso seco das células seguido de diluição (RODRIGUES *et al.*, 2003).

3.12. Cálculo do rendimento e produtividade em ácido láctico

O rendimento e produtividade em ácido láctico foram calculados através das seguintes equações:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{ácido lático formado (g/L)}}{\text{açúcar redutor inicial (g/L)}} \times 100$$

$$\text{Produtividade (g/ L. h)} = \frac{\text{ácido lático formado (g/L)}}{\text{tempo (h)}}$$

3.13. Determinação dos parâmetros cinéticos

3.13.1. Velocidade específica de crescimento microbiano

$$\mu_x = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt}$$

3.13.2. Velocidade específica de consumo de substrato

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left[- \frac{dS}{dt} \right]$$

3.13.3. Velocidade específica de formação do produto

$$\mu_p = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt}$$

3.14 Fatores de conversão

$$Y_{x/s} = \frac{X_m - X_0}{S_0 - S}$$

$$Y_{p/x} = \frac{P_m - P_0}{X_m - X_0}$$

$$Y_{p/s} = \frac{P_m - P_0}{S_0 - S}$$

Onde:

$Y_{x/s}$: fator de conversão do substrato em biomassa

$Y_{p/x}$: Razão da produção e biomassa produzida

$Y_{p/s}$: fator de conversão do substrato em produto

X_m : Biomassa máxima

X_0 : Biomassa inicial

S_0 : Substrato inicial consumido

S : Substrato final consumido

P_m : Produto final formado

P_0 : Produto inicial formado

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do suco de caju clarificado

Na Tabela 6 são apresentados os resultados referentes a determinação da composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado.

Tabela 6 - Composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado.

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

DL* - Limite de detecção

Conforme a Tabela 6, verifica-se que o suco de caju apresenta diversos minerais em sua composição, dos quais destacam-se 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).

A análise de pH do suco de caju apresentou um valor de 4,37 ± 0,01, sendo este superior ao encontrado por Soares *et al.* (2001), que encontrou um valor de pH igual a 4,28 no suco de caju clarificado.

4.2 Otimização do meio de cultura para produção de ácido lático

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para avaliação da biomassa e do ácido lático formados no final da fermentação de acordo com o planejamento experimental executado.

Tabela 7 - Planejamento experimental para otimização do meio de cultura usado na produção de ácido lático a partir do suco de caju clarificado e resultados experimentais de biomassa e produção de ácido lático pelo *Lactobacillus casei* B-442.

Ensaio	Açúcar redutor (g/L)	Sulfato de Amônio (g/L)	Biomassa (g/L)	Ácido Lático(g/L)
1	25	0	1,12 ± 0,29	24,30± 0,67
2	25	12	1,66 ± 0,13	27,00± 0,56
3	50	0	1,41 ± 0,36	43,20 ± 0,23
4	50	12	2,07 ± 0,25	40,50± 0,89
5	25	6	1,63 ± 0,21	27,00 ± 0,45
6	50	6	2,03 ± 0,23	45,00 ± 0,67
7	37,5	0	1,60 ± 0,24	35,10± 0,88
8	37,5	12	2,04 ± 0,06	27,00± 0,58
9	37,5	6	1,93 ± 0,06	32,40±0,96
10	37,5	6	1,83 ± 0,01	28,00± 0,34
11	37,5	6	1,85 ± 0,01	35,10± 0,37

A Tabela 8 apresenta os resultados de rendimento de produtividade em ácido lático de todos os pontos do planejamento experimental.

Tabela 8. Resultados de rendimento e produtividade de ácido láctico produzido pelo *Lactobacillus casei* B-442 a partir do suco de caju clarificado segundo o planejamento fatorial composto central.

Ensaio	A.R (g/L)	S.A (g/L)	A.L. (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade (g/L.h)
1	25	0	24,30± 0,67	81,35	1,27
2	25	12	27,00± 0,56	99,89	1,79
3	50	0	43,20 ± 0,23	92,58	1,71
4	50	12	40,50± 0,89	83,85	2,21
5	25	6	27,00 ± 0,45	95,74	1,69
6	50	6	45,00 ± 0,67	91,43	2,46
7	37,5	0	35,10± 0,88	91,62	1,74
8	37,5	12	27,00± 0,58	72,42	1,38
9	37,5	6	32,40±0,96	91,11	1,91
10	37,5	6	28,00± 0,34	90,53	1,75
11	37,5	6	35,10± 0,37	89,86	1,85

Onde:

A.R: Açúcares redutores

S.A: Sulfato de amônio

A.L: Ácido láctico

Os ensaios 1, 3 e 7 do planejamento experimental que não apresentavam suplementação de sulfato de amônio foram os pontos com uma das menores produtividades, caracterizando-se por um elevado tempo de fermentação e baixas concentrações de ácido láctico.

Podemos observar na tabela 6 que no ponto 6 do planejamento experimental (50 g/L de açúcar redutor e 6 g/L de sulfato de amônio) obteve-se a melhor produtividade (2,46 g/L.h), elevada produção de ácido láctico (45 g/L) e um alto rendimento (91,43%). Estes fatores se combinados, caracterizam este ensaio como o mais adequado para implementação industrial em trabalhos futuros.

Na Tabela 9 estão apresentados os efeitos estimados das variáveis independentes, açúcar redutor e sulfato de amônio, na concentração de biomassa no final da fermentação e a Tabela 10 estão apresentados a análise de variância para produção de biomassa.

Tabela 9. Efeitos estimados para a produção de biomassa do *Lactobacillus casei* B-442 segundo o planejamento experimental elaborado.

Fator	Biomassa	
	Efeito	S.E.
Média	1,91*	0,05*
Açúcar redutor (L)	0,37*	0,08*
Açúcar redutor (Q)	-0,30	0,12
Sulfato de Amônio (L)	0,55*	0,08*
Sulfato de Amônio (Q)	-0,33*	0,12
Açúcar x Sulfato	0,06	0,10

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a biomassa do *Lactobacillus casei* NRRL B-442 está expresso pela equação 1. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão está apresentada na Tabela 10.

$$Biomassa (g/L) = -0,35 + 0,08 AR (L) - 9,62 \times 10^{-4} AR^2 + 0,08 SA (L) - 4 \times 10^{-3} SA^2 + 4,25 \times 10^{-4} AR \times AS. \quad (1)$$

Onde:

AR: Açúcar redutor (g/L)

SA: Sulfato de amônio (g/L)

Tabela 10. Análise de variância para a produção de biomassa segundo o planejamento experimental elaborado (Equação 1).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de <i>F</i>
Regressão	0,83	5	0,166	18,44
Residual	0,04	5	0,009	
Total	0,87	10		
Coeficiente de correlação	0,95			
<i>F</i> tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Através da análise estatística foi possível observar que a equação 1 para o modelo de biomassa produzida foi estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança, pois o valor de F calculado (20,75) foi superior ao de F tabelado (5,05). Os resultados de biomassa apresentados na Tabela 7 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft). A Figura 6 apresenta a superfície de resposta obtida para a modelagem da biomassa produzida (Eq. 1).

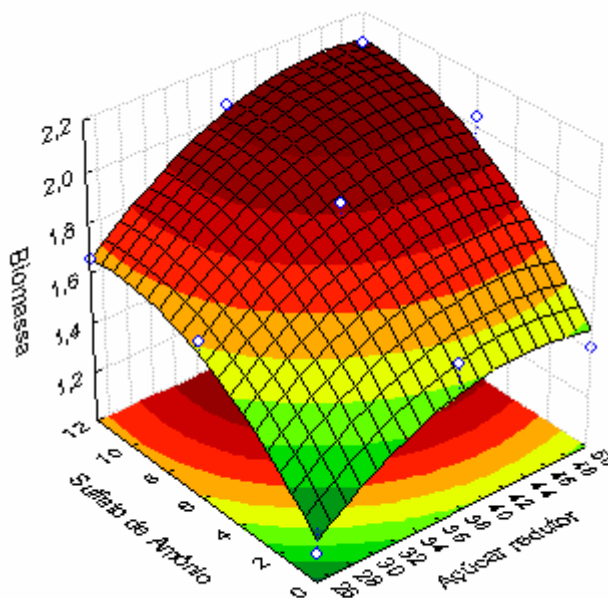


Figura 6. Superfície de resposta obtida para a produção de biomassa do *Lactobacillus casei* NRRL B- 442.

Na figura 6 é possível observar que o aumento da concentração de açúcares redutores combinado com quantidades intermediárias de sulfato de amônio (6 g/L) atuando como fonte de nitrogênio influenciou positivamente o aumento da biomassa, porém, quando a concentração de açúcares redutores é de 50 g/L e a concentração de sulfato de amônio é aumentada de 6 g/L para 12 g/L não há melhorias significativas no crescimento da biomassa.

Na tabela 11 estão apresentados os efeitos estimados das variáveis independentes, açúcares redutores e sulfato de amônio, sobre a concentração de ácido lático produzido no final da fermentação para o *Lactobacillus casei* B-442.

Tabela 11 – Efeitos estimados para a produção de ácido láctico para o *Lactobacillus casei* B-442 segundo o planejamento experimental elaborado.

Fator	Ácido Láctico	
	Efeito	S.E.
Média	32,14*	1,62*
Açúcar redutor (L)	16,80*	2,58*
Açúcar redutor (Q)	6,79	3,97
Sulfato de Amônio (L)	-2,70	2,58
Sulfato de Amônio (Q)	-3,11	3,97
Açúcar x Sulfato	-2,70	3,16

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para o ácido láctico produzido pelo *Lactobacillus casei* B-442 está expresso na equação 2. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão está apresentada na Tabela 12.

$$\text{Ácido Láctico (g/L)} = 33,24 - 0,85AR (L) + 0,02 AR^2 + 0,97 SA (L) - 0,04 SA^2 - 1,8 \times 10^{-2} AR \times SA. \quad (2)$$

AR: Açúcar redutor (g/L)

SA: Sulfato de amônio (g/L)

Tabela 12. Análise de variância para a produção do ácido láctico segundo o planejamento fatorial composto central. (Equação 02).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de <i>F</i>
Regressão	471,94	5	94,40	9,44
Residual	49,99	5	10,00	
Total	521,93	10		
Coeficiente de correlação	0,90			
<i>F</i> tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Através da análise de variância para o ácido lático foi possível observar que o modelo para o ácido lático foi estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança, visto que, o F calculado (9,44) foi superior ao F tabelado (5,05).

Os resultados de produção de ácido lático apresentados na Tabela 7 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft). A Figura 7 apresenta a superfície de resposta obtida para o ácido lático (Eq.2).

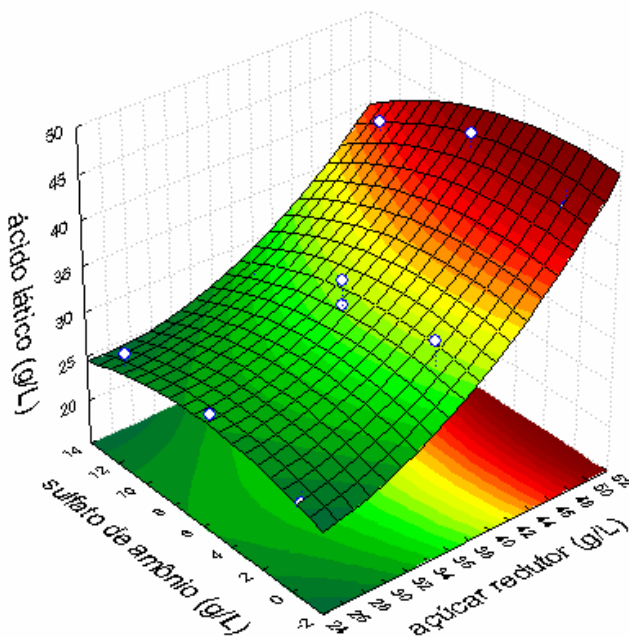


Figura 7 Superfície de resposta para a produção de ácido lático pelo *Lactobacillus casei* B-442.

Observa-se a superfície de resposta da Figura 7 que elevadas concentrações de açúcares redutores determinam um aumento na produção de ácido lático pelo *Lactobacillus casei* B-442. Concentrações acima de 6 g/L de sulfato de amônio quando altas concentrações de açúcares foram empregadas resultaram em um decréscimo do ácido lático produzido. Verifica-se que dentro da faixa experimental estudada, as melhores condições para produção do ácido lático são: 50 g/L de açúcar redutor e 6 g/L de sulfato de amônio.

4.3 Otimização das variáveis pH e temperatura para produção de ácido láctico.

Foi realizado um segundo planejamento experimental com o melhor ensaio obtido (ensaio 6) do planejamento experimental anterior (50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio). Nesta condição foi obtida uma produtividade de 2,46 g/L.h e rendimento de 91,43%. O objetivo deste segundo planejamento foi analisar a influência das variáveis: pH e temperatura na produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442.

A tabela 13 apresenta os resultados de biomassa, rendimento e produtividade em ácido láctico para o *Lactobacillus casei* B-442 a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio .

Tabela 13. Resultados de biomassa, rendimento e produtividade em ácido láctico para o *Lactobacillus casei* B-442 para o planejamento experimental executado variando pH e temperatura.

Ensaio	pH	T (°C)	Bio (g/L)	A.L (g/L)	Rend (%)	Prod (g/L.h)
1	6	29	1,20 ± 0,15	32,40±0,23	66,3	2,09
2	7	29	1,45 ± 0,39	37,80±0,58	76,71	2,52
3	6	45	0,75 ± 0,18	36,45± 0,75	74,07	2,35
4	7	45	0,76 ± 1,41	23,76± 0,33	60,89	1,32
5	6,5	37	2,03 ± 0,71	43,20±0,48	87,77	2,36
6	6,5	37	1,96±0,63	41,23± 0,75	83,77	2,37
7	6,5	37	2,038±0,69	42,82±0,52	87	2,35

Onde:

T: Temperatura

Bio: Biomassa

A.L: Ácido láctico

Rend: Rendimento

Prod: Produtividade

As variáveis pH e temperatura não foram estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança para produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442 apresentando valores de F calculado muito inferiores aos valores de F tabelado. De acordo

com a análise estatística, tanto o pH quanto a temperatura não apresentaram efeito significativo na produção de ácido láctico. Dessa forma, a metodologia de superfície de reposta não pôde ser empregada. Entretanto, os três últimos pontos do planejamento (5, 6 e 7) apresentaram elevadas concentrações de biomassa e ácido láctico, e os mais altos rendimentos e produtividade comparado com os demais pontos. Esse resultado reforça a evidência experimental que a melhor temperatura e pH para o crescimento e produção de ácido láctico para o *Lactobacillus casei* B-442 são respectivamente 37°C e 6,5.

Resultados semelhantes foram encontrados pelos pesquisadores Hujanen e Linko (1996), que estudaram o efeito de várias temperaturas (30, 37, 41 e 45°C) para produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-441 e encontraram a temperatura de 37°C como ótima para crescimento e produção de ácido láctico. Dermici e colaboradores (1993) também relataram que a temperatura de 37°C foi a melhor temperatura para o *Lactobacillus casei* ATCC 11443.

Hujanen e colaboradores (2001) otimizaram condições de cultivo e produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-441 variando temperatura, pH e fontes de nitrogênio em meio sintético. A temperatura ótima para produção de ácido láctico foi de 35°C e pH ótimo de 6,3. A concentração mais elevada de ácido láctico foi de 118,6 g/L, sendo esse valor obtido a partir de uma concentração de 160 g/L de açúcar inicial, isto é, rendimento de 74,125%. Esse rendimento foi inferior ao que encontramos no nosso planejamento (86,18%).

4.4 Estudo cinético para produção de ácido láctico variando a concentração de açúcares redutores.

O estudo cinético foi realizado para quantidades variadas de açúcares no meio de cultura. O primeiro estudo foi feito com o meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e o segundo com 50 g/L, o terceiro com 40 g/L, o quarto com a concentração de 30 g/L e o quinto e último ensaio foi feito com 20 g/L de açúcares redutores. Em todos os ensaios foi mantida a proporção ótima de fonte de nitrogênio com relação aos açúcares redutores. No ponto 6 do primeiro planejamento, no qual variamos a concentração de açúcares redutores e sulfato de amônio, foi encontrado uma proporção de 50 g/L de açúcares redutores para 6 g/L de sulfato de amônio como melhor ponto, e esta proporção de fonte de

carbono para fonte suplementar de nitrogênio (8,33) foi a utilizada para todos os outros ensaios cinéticos. Analisando o planejamento anterior, no qual foi estudado a influência da temperatura e pH na produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442, foi escolhido para o estudo cinético o pH 6,5 e temperatura a 37°C por apresentarem melhores resultados tanto no crescimento celular quanto na produtividade e rendimento em ácido láctico.

A Tabela 14 apresenta os resultados para biomassa, ácido láctico, taxa de crescimento microbiano, taxa de consumo do substrato e taxa de formação do produto através do estudo cinético realizado utilizando suco de caju clarificado como substrato contendo 60 g/L de açúcares redutores.

Tabela 14. Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37 °C e pH 6,5.

Tempo(h)	Biomassa(g/L)	AR(g/L)	AL (g/L)	μX	μS	μP
0	0,21±0,00	66,98±1,39	0	0	0	0
1	0,24±0,03	59,00±2,51	1,12±0,02	0,14	11,27	4,69
2	0,27±0,08	61,51±3,15	2,28±0,04	0,32	-2,52	4,27
3	0,42±0,03	60,39±0,56	3,48±0,05	0,20	0,49	2,90
4	0,45±0,03	61,10±3,34	4,71±0,03	0,06	2,95	2,83
5	0,47±0,05	57,76±1,67	6,00±0,08	0,12	-0,64	4,01
6	0,56±0,03	61,70±2,64	8,51±0,02	0,16	-2,86	4,02
7	0,65±0,01	60,96±2,37	10,50±0,05	0,13	3,28	3,56
8	0,72±0,01	57,43±1,62	13,16±0,06	0,25	6,51	3,72
9	1,02±0,01	51,54±0,19	15,88±0,09	0,16	4,06	3,59
10	1,05±0,05	49,17±0,23	20,47±0,08	0,08	2,75	3,54
11	1,18±0,05	45,74±1,53	23,36±0,15	0,11	1,22	2,99
12	1,32±0,02	46,30±0,70	27,52±0,13	0,08	1,69	2,06
13	1,39±0,06	41,27±1,65	28,80±0,18	0,01	2,75	1,39
14	1,34±0,09	38,69±0,63	31,36±0,17	0,01	1,65	1,10
21	1,53±0,02	23,66±0,22	40,50±0,22	0,02	1,37	0,78
24	1,59±0,06	17,77±0,35	43,28±0,21	0,01	1,35	0,56
28	1,62±0,02	8,66±0,33	46,74±0,30	0,00	1,41	0,53
31	1,66±0,01	3,16±0,19	49,73±0,34	0,01	1,10	0,60

Onde:

μX : Taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1})

μS : Taxa específica de consumo de substrato (h^{-1})

μP : Taxa específica de formação do produto (h^{-1})

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico através do estudo cinético realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores. A produtividade máxima (2,29 g/L×h) foi obtida em doze horas de fermentação e essa produtividade decresce gradativamente até o final da fermentação. Hujanen e colaboradores (2001) encontraram

produtividade máxima em ácido lático de 4,4 g/L.h em quinze horas de fermentação para a concentração inicial de glicose de 100 g/L utilizando o *Lactobacillus casei* B-441. Os mesmos autores reportaram rendimento no final da fermentação para um meio contendo 60 g/L de açúcares redutores de 74,24% de substrato convertido em ácido lático.

Tabela 15. Resultados do estudo cinético para rendimento e produtividade em ácido lático no meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Ensaio	Tempo (horas)	Rendimento(%)	Produtividade(g/L.h)
1	0	0	0
2	1	1,67	1,12
3	2	3,40	1,14
4	3	5,19	1,16
5	4	7,03	1,18
6	5	8,96	1,2
7	6	12,70	1,42
8	7	15,68	1,5
9	8	19,64	1,64
10	9	23,71	1,76
11	10	30,56	2,05
12	11	34,88	2,12
13	12	41,09	2,29
14	13	43,00	2,22
15	14	46,82	2,24
16	21	60,46	1,93
17	24	64,61	1,80
18	28	69,78	1,67
19	31	74,24	1,60

A Figura 7 apresenta os perfis de concentração celular, consumo de açúcares redutores e ácido lático formado durante o estudo cinético com o meio contendo suco de caju com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio.

Observando o gráfico da figura 8 é possível notar que o tempo de fermentação foi também bem superior aos outros estudos cinéticos realizados.

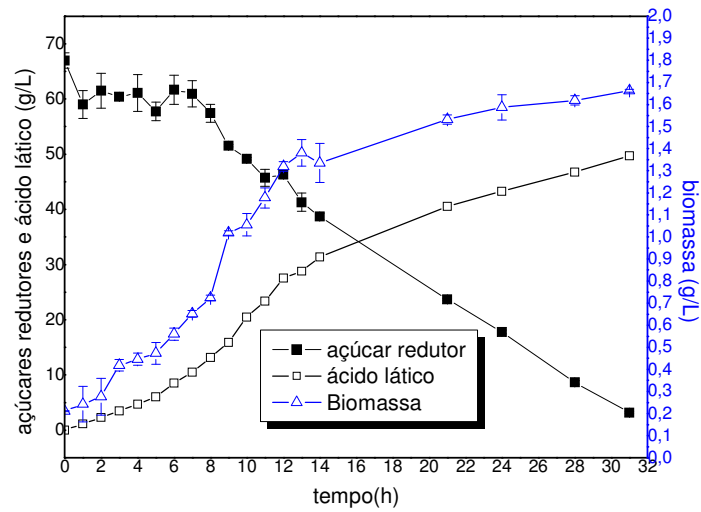


Figura 8. Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido lático produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores inicial; 7,2 g/L de sulfato de amônio para cultivo de *Lactobacillus casei* B-422 a 37°C e pH 6,5.

A Tabela 16 apresenta os resultados para biomassa, ácido lático, taxa específica de crescimento microbiano, taxa específica de consumo do substrato e taxa específica de formação do produto através do estudo cinético realizado utilizando suco de caju clarificado como substrato contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio.

Tabela 16. Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Tempo(h)	Biomassa(g/L)	A.R (g/L)	A.L (g/L)	μX	μS	μP
0	0,21±0,01	58,08±0,05	0	0	0	0
1	0,24±0,00	56,60±0,32	1,12±0,01	0,19	7,25	5,92
2	0,30±0,00	54,60±1,67	2,84±0,01	0,45	9,36	5,83
3	0,51±0,00	50,98±0,09	4,62±0,04	0,51	6,34	3,54
4	0,82±0,01	48,15±1,62	6,44±0,02	0,26	3,11	2,62
5	0,94±0,06	45,88±0,37	8,90±0,03	0,09	3,02	2,96
6	0,98±0,03	42,49±1,25	12,00±0,05	0,08	3,72	3,19
7	1,09±0,09	38,59±0,70	15,16±0,07	0,08	2,10	2,93
8	1,15±0,05	37,90±0,37	18,41±0,09	0,04	1,82	3,11
9	1,20±0,01	34,42±1,90	22,29±0,10	0,06	2,91	2,80
10	1,28±0,02	30,94±0,56	25,12±0,14	0,06	3,13	3,11
11	1,35±0,01	26,37±0,07	30,28±0,18	0,07	1,84	3,64
12	1,48±0,03	25,98±0,98	34,94±0,12	0,08	1,42	2,99
13	1,58±0,01	22,16±1,09	39,12±0,19	0,08	2,53	2,68
14	1,72±0,03	17,99±0,13	43,38±0,30	0,01	1,02	1,08
21	1,66±0,02	8,14±0,13	54,00±0,48	0,01	0,85	0,76
24	1,81±0,04	3,93±0,58	56,00±0,54	0,01	0,51	0,41
28	1,74±0,01	1,71±0,06	59,26±0,51	-0,01	0,32	0,47

Onde:

μX : Taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1})

μS : Taxa específica de consumo de substrato (h^{-1})

μP : Taxa específica de formação do produto (h^{-1})

A Tabela 17 apresenta os resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido lático no meio de caju contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio. Observa-se que a máxima produtividade (3,10 g/L×h) foi obtida na décima quarta hora de fermentação. Após esse tempo a produtividade foi decrescendo gradativamente e o rendimento ao final da fermentação foi de 100%.

Tabela 17. Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Ensaio	Tempo (h)	Rendimento(%)	Produtividade(g/L.h)
1	0	0	0
2	1	1,93	1,12
3	2	4,89	1,42
4	3	7,95	1,54
5	4	11,09	1,61
6	5	15,32	1,78
7	6	20,66	2,00
8	7	26,10	2,17
9	8	31,69	2,30
10	9	38,38	2,48
11	10	43,24	2,51
12	11	52,13	2,75
13	12	60,16	2,91
14	13	67,35	3,01
15	14	74,69	3,10
16	21	92,97	2,57
17	24	96,41	2,33
18	28	102,03	2,12

A Figura 9 apresenta os perfis de concentração celular, consumo de açúcares redutores e ácido láctico formado durante o estudo cinético com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de sulfato de amônio.

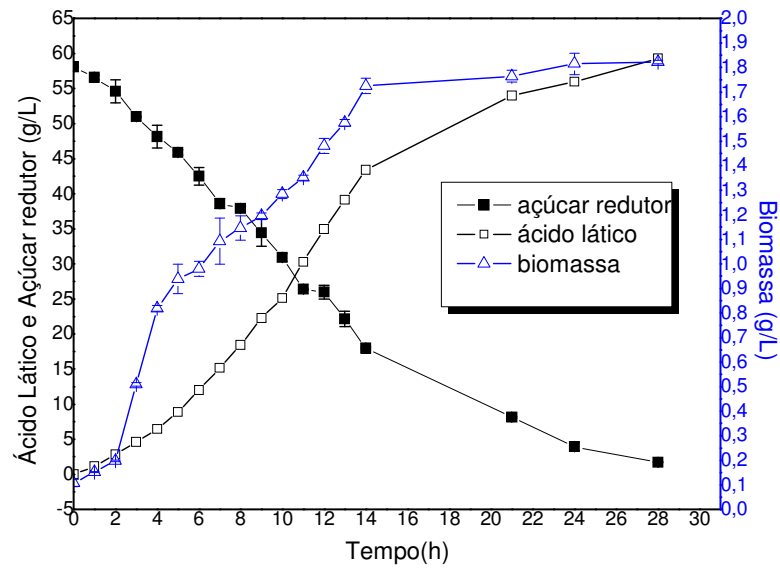


Figura 9. Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido lático produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores inicial e 6 g/L de sulfato de amônio para cultivo do *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

A Tabela 18 apresenta os resultados para biomassa, ácido lático, taxa de crescimento microbiano, taxa de consumo do substrato e taxa de formação do produto através do estudo cinético realizado utilizando suco de caju clarificado como substrato contendo 40 g/L de açúcares redutores e 4,8 g/L de sulfato de amônio.

Tabela 18. Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores e 4,8 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Tempo(h)	Biomassa (g/L)	AR (g/L)	AL(g/L)	μX	μS	μP
0	0,20±0,00	38,87±1,99	0	0	0	0
1	0,23±0,01	37,62±1,95	0	0,03	7,41	2,53
2	0,21±0,01	35,53±2,18	1,14±0,04	0,26	5,02	5,47
3	0,34±0,01	35,49±0,37	2,33±0,07	0,50	3,45	4,44
4	0,55±0,04	33,21±0,88	4,13±0,05	0,37	6,81	3,88
5	0,74±0,06	28,02±0,51	6,58±0,02	0,24	3,97	3,35
6	0,91±0,01	27,32±0,09	9,10±0,15	0,20	0,94	3,77
7	1,10±0,02	26,30±2,13	13,44±0,12	0,20	2,02	3,69
8	1,35±0,07	22,87±1,39	17,26±0,19	0,15	2,67	3,06
9	1,50±0,05	19,06±1,21	21,72±0,27	0,09	1,88	2,81
10	1,61±0,02	17,23±0,30	25,68±0,24	0,04	1,79	2,12
11	1,64±0,01	13,29±0,06	28,58±0,32	0,02	1,63	1,80
12	1,69±0,02	11,90±0,07	31,57±0,48	0,05	0,95	1,63
13	1,80±0,01	10,07±0,06	34,08±0,65	0,01	0,84	0,63
19	1,77±0,06	1,29±0,44	39,51±0,57	0,08	-0,44	1,48

Onde:

μX : Taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1})

μS : Taxa específica de consumo de substrato (h^{-1})

μP : Taxa específica de formação do produto (h^{-1})

A tabela 19 apresenta os resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores e 4,8 g/L de sulfato de amônio.

Tabela 19. Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado 40 g/L de açúcares redutores e 4,8 g/L de sulfato de amônio para cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Ensaio	Tempo(h)	Rendimento(%)	Produtividade(g/L.h)
1	0	0	0
2	1	0	0
3	2	2,93	0,57
4	3	5,99	0,78
5	4	10,62	1,03
6	5	16,94	1,32
7	6	23,41	1,52
8	7	34,57	1,92
9	8	44,40	2,16
10	9	55,87	2,41
11	10	66,06	2,57
12	11	73,52	2,60
13	12	81,21	2,63
14	13	87,66	2,62
15	19	101,64	2,08

A figura 10 apresenta o perfil do açúcar consumido, ácido láctico produzido e concentração celular durante o estudo cinético realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores e 4,8 g/L de sulfato de amônio.

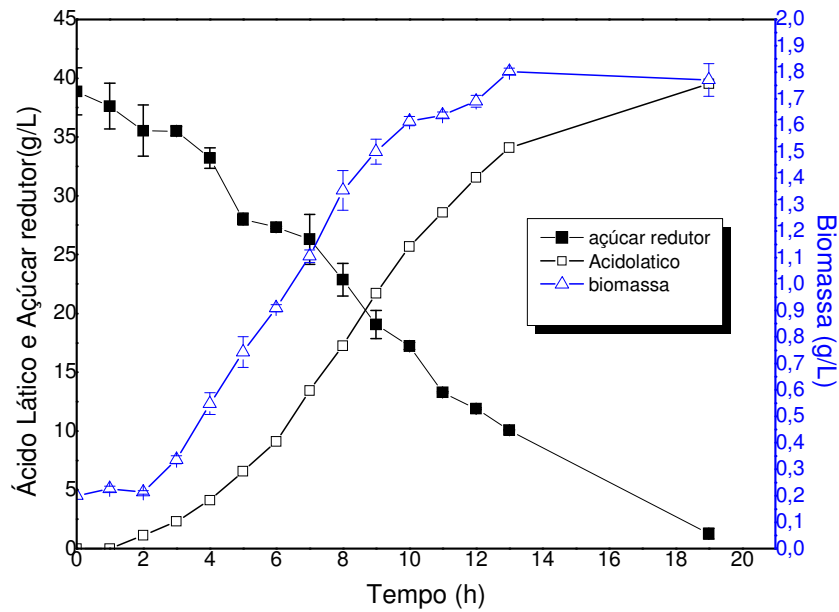


Figura 10. Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido lático produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores inicial e 4,8 g/L de sulfato de amônio para o cultivo do *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

A Tabela 20 apresenta os resultados para biomassa, ácido lático, taxa específica de crescimento microbiano, taxa específica de consumo do substrato e taxa específica de formação do produto através do estudo cinético realizado utilizando suco de caju clarificado como substrato contendo 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato de amônio.

Tabela 20. Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato do amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Tempo(h)	Biomassa(g/L)	AR(g/L)	A.L(g/L)	μX	μS	μP
0	0,18±0,00	28,02±4,61	0	0	0	0
1	0,21±0,00	29,60±0,92	0,54±0,10	0,18	4,64	5,78
2	0,27±0,02	26,48±0,09	2,67±0,04	0,02	3,59	6,95
3	0,24±0,00	28,55±0,83	4,25±0,05	0,24	3,26	7,50
4	0,39±0,01	25,87±1,23	6,33±0,03	0,34	5,39	6,00
5	0,51±0,01	24,38±2,90	8,88±0,09	0,32	7,37	5,43
6	0,71±0,07	23,59±1,76	11,87±0,15	0,27	4,44	3,83
7	0,89±0,06	16,08±0,57	14,32±0,18	0,24	1,96	3,23
8	1,15±0,02	14,85±2,06	17,66±0,27	0,22	1,06	2,48
9	1,49±0,04	11,64±0,00	20,00±0,12	0,11	0,86	1,66
10	1,69±0,01	14,46±0,18	22,29±0,25	0,02	0,66	1,27
11	1,82±0,02	11,73±0,11	23,65±0,34	0,02	0,98	0,93
12	1,28±0,04	9,59±0,20	24,99±0,27	0,00	0,88	0,50
14	1,64±0,04	7,81±0,03	25,88±0,36	-0,01	1,26	0,41
15	1,77±0,05	4,11±0,08	26,76±0,08	0,01	2,12	0,60
16	1,74±0,02	1,63±0,26	27,63±0,22	0,00	0,46	0,18
20	1,58±0,00	0,73±0,03	28,06±0,37	0,06	-0,07	1,17

Onde:

μX : Taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1})

μS : Taxa específica de consumo de substrato (h^{-1})

μP : Taxa específica de formação do produto (h^{-1})

No meio contendo 30 g/L de açúcares redutores a produtividade máxima (2,23 g/L.h) ocorreu na décima hora de fermentação e o rendimento foi de 100%, ou seja, todo substrato foi convertido em ácido láctico.

A tabela 21 apresenta os resultados para o rendimento e a produtividade em ácido láctico durante o estudo cinético realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato de amônio.

Tabela 21. Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Ensaio	Tempo (h)	Rendimento(%)	Produtividade(g/L.h)
1	0	0	0
2	1	1,93	0,54
3	2	9,53	1,33
4	3	15,17	1,42
5	4	22,59	1,58
6	5	31,69	1,78
7	6	42,36	1,98
8	7	51,11	2,05
9	8	63,03	2,21
10	9	71,38	2,22
11	10	79,55	2,23
12	11	84,40	2,15
13	12	89,19	2,08
14	14	92,36	1,85
15	15	95,50	1,78
16	16	98,61	1,73
17	20	100,14	1,40

A figura 11 apresenta o perfil de concentração celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido pelo *Lactobacillus casei* B-442 durante o estudo cinético realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato de amônio.

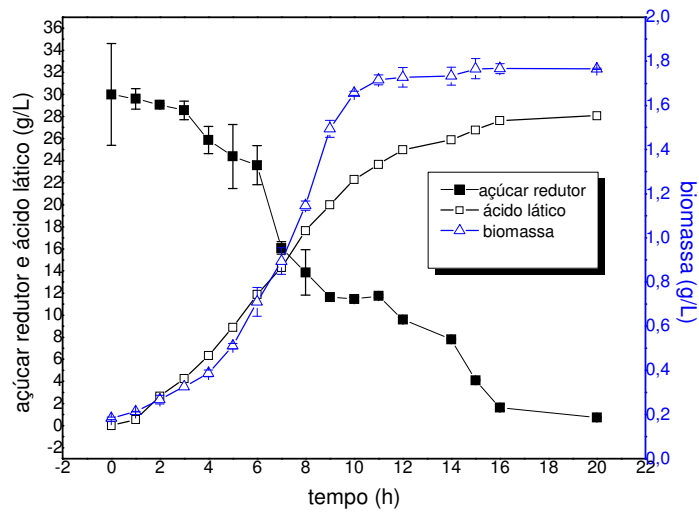


Figura 11. Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido lático produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores inicial e 3,6 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

A Tabela 22 apresenta os resultados para biomassa, ácido lático, taxa específica de crescimento microbiano, taxa específica de consumo do substrato e taxa específica de formação do produto através do estudo cinético realizado utilizando suco de caju clarificado como substrato contendo 20 g/L de açúcares redutores e 2,4 g/L de sulfato de amônio.

Tabela 22. Resultado do o estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 2,4 g/L de sulfato de amônio para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Tempo(h)	Biomassa(g/L)	AR(g/L)	A.L(g/L)	μX	μS	μP
0	0,18±0,00	17,86±1,16	0	0	0	0
1	0,22±0,01	17,07±1,91	0	0,15	9,18	2,45
2	0,25±0,06	14,86±0,12	1,07±0,05	0,04	2,62	5,38
3	0,24±0,05	15,77±1,21	2,67±0,08	0,26	4,37	6,74
4	0,37±0,02	14,80±0,44	4,25±0,04	0,24	3,00	4,93
5	0,41±0,00	13,55±0,53	6,32±0,07	0,33	4,52	4,98
6	1,03±0,02	11,06±0,49	8,37±0,12	0,29	3,35	3,15
7	0,78±0,03	9,24±0,22	10,38±0,11	0,16	2,81	3,17
8	0,90±0,02	6,56±0,30	13,34±0,24	0,10	2,26	1,92
9	0,97±0,02	5,16±0,18	13,83±0,30	0,05	1,93	1,50
10	0,94±0,00	2,93±0,86	16,24±0,17	0,03	1,44	1,70
11	1,01±0,02	2,32±0,05	17,19±0,41	0,05	1,12	1,16
12	1,09±0,01	0,65±0,04	18,60±0,39	-0,01	-0,14	-0,12

Onde:

μX : Taxa específica de crescimento microbiano (h^{-1})

μS : Taxa específica de consumo de substrato (h^{-1})

μP : Taxa específica de formação do produto (h^{-1})

A Tabela 23 apresenta os resultados para o rendimento e produtividade em ácido láctico através do estudo cinético realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 2,4 g/L de sulfato de amônio.

Tabela 23. Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 6 g/L para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Pontos	Tempo(h)	Rendimento(%)	Produtividade(g/L.h)
1	0	0	0
2	1	0	0
3	2	5,99	0,53
4	3	14,95	0,89
5	4	23,79	1,06
6	5	35,38	1,26
7	6	46,85	1,40
8	7	58,11	1,48
9	8	74,68	1,67
10	9	77,42	1,54
11	10	90,91	1,62
12	11	96,23	1,56
13	12	104,12	1,55

A Figura 12 apresenta o perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido pelo *Lactobacillus casei* B-442 durante o estudo cinético realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 2,4 g/L de sulfato de amônio.

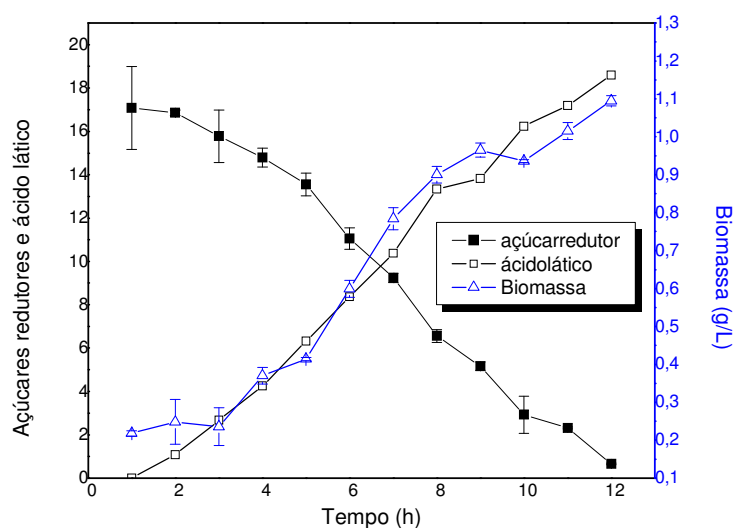


Figura 12. Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido láctico produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores inicial 2,4 g/L de sulfato de amônio para o cultivo do *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

De acordo com todos os ensaios do estudo cinético realizado observa-se através das tabelas que o ensaio realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio apresentou os melhores resultados em relação a produtividade, rendimento, produção de ácido láctico e biomassa. A produtividade máxima do meio contendo 50 g/L de açúcares redutores foi de 3,10 g/L.h após 14 horas, valor este que foi superior a todos os outros ensaios do estudo cinético realizado com concentrações variadas de açúcares redutores e sulfato de amônio. Já para o rendimento, não foi observada diferença entre os estudos realizados com diferentes concentrações de açúcar, uma vez que em todos os ensaios do estudo cinético realizado o rendimento foi bem próximo a 100%, exceto para o meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio, que apresentou rendimento de 74,24%.

Observando os gráficos das Figuras 8, 9, 10, 11 e 12, verifica-se que o processo fermentativo é classificado como parcialmente associativo com maior produção associada ao crescimento, pois à medida que ocorre o crescimento celular há também, associado ao crescimento, a produção de ácido láctico. Entretanto, a produção de ácido láctico continua, a taxas reduzidas na fase estacionária. O comportamento parcialmente associativo é evidenciado pelos gráficos das velocidades específicas de crescimento microbiano (μ_X)

versus velocidades específicas de formação de produto (μP) apresentados nos anexos: P, Q, R, S e T. Observa-se nos gráficos de $\ln X$ versus tempo de fermentação, apresentados nos anexos H, I, J, L e M, que a fase LAG do *Lactobacillus casei* B-442 foi praticamente inexistente e que o microrganismo adaptou-se bem no meio contendo suco de caju clarificado suplementado com sulfato de amônio.

4.5 Estudo cinético utilizando o meio sintético e o suco de caju clarificado suplementado com extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

O novo estudo cinético foi realizado utilizando um meio sintético e o suco de caju clarificado, ambos contendo 50 g/L de açúcares redutores e suplementados com 6 g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Essa concentração foi escolhida a partir dos resultados obtidos no estudo cinético anterior, onde o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio apresentou os melhores resultados para produtividade e rendimento em ácido láctico.

A Tabela 24 apresenta os resultados para biomassa, ácido láctico, taxa de crescimento microbiano, taxa de consumo do substrato e taxa de formação do produto através do estudo cinético realizado utilizando o meio sintético como substrato contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.

Tabela 24. Resultado do estudo cinético realizado com o meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Tempo (h)	Biomassa(g/L)	AR(g/L)	A.L(g/L)	μX	μS	μP
0	0,14±0,00	45,81±0,24	0	0	0	0
1	0,17±0,00	42,06±0,38	0,55±0,02	0,25	17,21	3,21
2	0,23±0,00	39,97±0,95	1,09±0,10	0,06	0,00	2,40
3	0,20±0,03	42,06±0,38	1,64±0,06	0,61	3,00	5,50
4	0,47±0,00	38,78±0,71	3,27±0,08	0,53	6,63	4,01
5	0,69±0,01	35,84±0,33	5,40±0,14	0,34	5,54	3,42
6	0,94±0,01	31,09±1,85	8,02±0,15	0,41	3,41	3,57
7	1,47±0,15	29,43±1,99	12,10±0,23	0,31	2,27	2,90
8	1,85±0,08	24,40±0,19	16,55±0,39	0,07	3,41	3,36
9	1,72±0,04	16,80±0,38	24,54±0,67	0,16	2,25	2,98
10	2,40±0,03	16,64±0,25	26,80±0,59	0,16	0,94	1,92
11	2,47±0,03	12,28±0,05	33,75±0,38	0,05	1,90	2,49
12	2,64±0,05	7,23±0,57	39,10±0,41	0,04	1,77	2,26
13	2,68±0,01	2,92±0,11	45,70±0,63	0,00	0,36	0,55

Onde:

μX: Taxa específica de crescimento microbiano (h⁻¹)

μS: Taxa específica de consumo de substrato (h⁻¹)

μP: Taxa específica de formação do produto (h⁻¹)

A tabela 25 apresenta os resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico pelo *Lactobacillus casei* B-442 a partir do meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.

Tabela 25. Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo do *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Pontos	Tempo (h)	Rendimento (%)	Produtividade (g/L.h)
1	0	0	0
2	1	1,20	0,55
3	2	2,38	0,54
4	3	3,59	0,55
5	4	7,13	0,82
6	5	11,79	1,08
7	6	17,51	1,34
8	7	26,41	1,73
9	8	36,13	2,07
10	9	53,57	2,73
11	10	58,50	2,68
12	11	73,67	3,07
13	12	85,35	3,26
14	13	99,76	3,51

É possível observar que o meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores suplementado com 6 g/L de extrato de levedura apresentou resultados ligeiramente superiores para produtividade e rendimento em ácido láctico, de 3,51 g/L.h após 13 horas e 100% respectivamente, e o menor tempo de fermentação (13 horas) quando comparado com o ensaio do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e suplementado com 6 g/L de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, este apresentou uma produtividade máxima de 3,10 g/L.xh após 14 horas de fermentação e um rendimento de 100%. Mas levando em conta o custo de um meio sintético adicionado de açúcares puros (glicose e frutose), sais minerais e o extrato de levedura, o custo do processo torna-se elevado e economicamente inviável, já que com o suco de caju clarificado suplementado com o sulfato de amônio foi obtido resultado semelhante e satisfatório utilizando um substrato barato, diminuindo dessa forma os custos do processo sem diminuir substancialmente sua eficiência. Esse fato também foi comprovado por Nancib e colaboradores (2005), que estudaram o efeito de várias fontes de nitrogênio no suco de tâmara e o estudo evidenciou que o suco suplementado com o extrato de levedura apresentou

melhores resultados, mas resultados semelhantes foram obtidos com a suplementação do sulfato de amônio, que possui um custo bem inferior ao extrato de levedura, cerca de seis vezes mais barato.

A utilização do suco de caju ainda possui mais uma vantagem em relação ao meio sintético, é que no suco de caju não há necessidade de suplementação de vitaminas e sais minerais, pois o suco de caju apresenta boas quantidades de vitaminas, minerais e aminoácidos, tais como, glicina, alanina, prolina, leucina, isoleucina, metionina dentre outros, segundo Rocha e colaboradores (2009), que são essenciais para o crescimento de bactérias lácticas.

A Figura 13 apresenta o perfil de crescimento microbiano, açúcar consumido e ácido lático produzido pelo *Lactobacillus casei* B-442 obtido através do estudo cinético realizado a partir do meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.

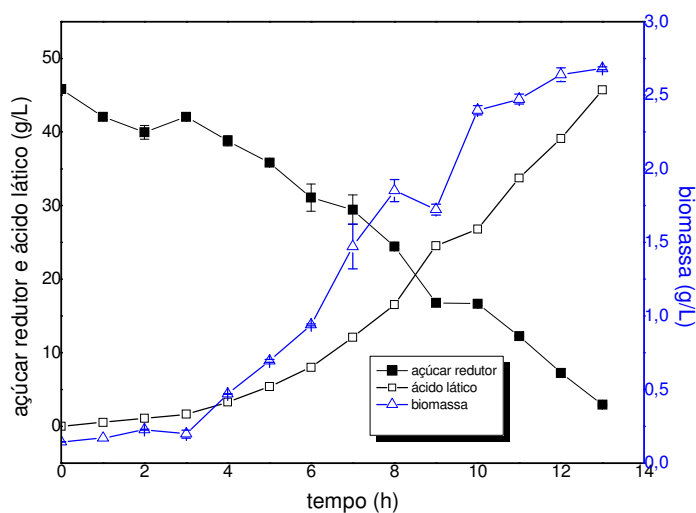


Figura 13. Relação entre o crescimento microbiano, açúcar consumido e o ácido lático produzido pelo *Lactobacillus casei* B-442 a 37 °C e pH 6,5, a partir do meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.

A Tabela 26 apresenta os resultados dos parâmetros de transformação para o ensaio realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.

Tabela 26 Resultado do estudo cinético realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo do *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5.

Tempo(h)	Biomassa(g/L)	AR(g/L)	A.L(g/L)	μX	μS	μP
0	0,21±0,00	57,25±2,66	0	0	0	0
1	0,25±0,00	58,39±1,61	0,55±0,12	0,25	-3,40	2,17
2	0,34±0,00	58,96±0,76	1,09±0,04	0,19	1,74	3,18
3	0,38±0,04	57,21±2,14	2,72±0,08	0,33	1,26	4,29
4	0,59±0,03	58,01±0,95	4,33±0,17	0,31	0,93	3,61
5	0,74±0,03	56,12±0,95	6,97±0,19	0,34	3,13	3,52
6	1,09±0,03	53,36±0,57	9,56±0,09	0,31	4,02	2,59
7	1,43±0,01	47,38±3,80	12,6±0,24	0,28	4,43	2,11
8	1,88±0,05	40,73±2,66	15,57±0,21	0,18	2,99	2,06
9	2,09±0,09	36,12±3,56	20,37±0,35	0,11	1,59	1,93
10	2,35±0,05	34,07±0,84	23,63±0,27	0,08	1,30	1,46
11	2,45±0,01	30,01±0,65	27,24±0,44	0,07	1,71	1,37
12	2,67±0,01	25,69±0,10	30,32±0,18	0,06	1,08	0,98
13	2,77±0,03	24,23±0,04	32,47±0,39	-0,01	0,92	0,77
14	2,62±0,07	20,62±0,23	34,59±0,21	0,00	0,72	0,54
21	2,76±0,05	9,22±0,18	43,84±0,27	0,00	0,61	0,42
24	2,72±0,04	3,88±0,50	46,14±0,68	-0,02	0,48	0,17
26	2,53±0,02	2,66±0,48	46,14±0,52	-0,04	0,24	0,00

Onde:

μX: Taxa específica de crescimento microbiano (h⁻¹)

μS: Taxa específica de consumo de substrato (h⁻¹)

μP: Taxa específica de formação do produto (h⁻¹)

A Tabela 27 apresenta os resultados para o rendimento e produtividade em ácido láctico a partir do ensaio realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.

Tabela 27. Resultados do estudo cinético para o rendimento e produtividade em ácido láctico no meio contendo suco de caju com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura para o cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e pH 6,5

Pontos	Tempo (h)	Rendimento(%)	Produtividade (g/L.h)
1	0	0	0
2	1	0,93	0,55
3	2	1,85	0,54
4	3	4,61	0,91
5	4	7,34	1,08
6	5	11,82	1,39
7	6	16,21	1,59
8	7	21,37	1,80
9	8	26,41	1,95
10	9	34,55	2,26
11	10	40,08	2,36
12	11	46,20	2,48
13	12	51,42	2,53
14	13	55,07	2,50
15	14	58,66	2,47
16	21	74,35	2,09
17	24	78,25	1,92
18	26	78,25	1,78

Observando a Tabela 27 é possível notar que, no ensaio realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura. O valor de produtividade máxima (2,53 g/L.h) após 12 horas de fermentação foi inferior ao encontrado com o ensaio realizado com o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio (3,10 g/L.h) e inferior também à produtividade máxima encontrada no meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura (3,51 g/L.h). Mas é notável a grande concentração de biomassa formada durante a fermentação e rendimento em ácido láctico inferior quando comparado ao meio contendo suco de caju suplementado com o sulfato de amônio. Neste ensaio, o microrganismo cresceu mais e produziu menos ácido láctico.

A Figura 14 apresenta o perfil de concentração celular, açúcar consumido e produção de ácido lático pelo *Lactobacillus casei* B-442 obtido através do estudo cinético realizado a partir do meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/l de açúcares redutores e 6 g/L de extrato de levedura.

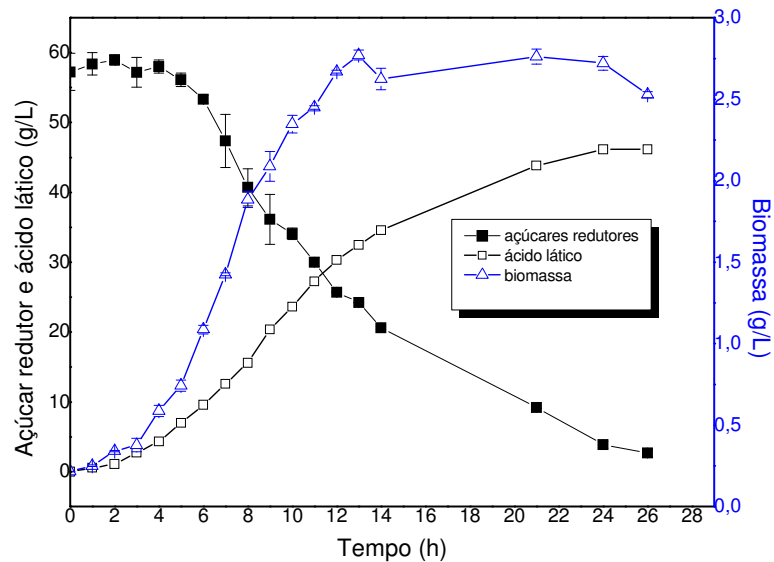


Figura 14. Perfil de crescimento celular, açúcar consumido e ácido lático produzido no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores inicial e 6 g/L de extrato de levedura a 37°C e pH 6,5.

A Tabela 28 apresenta os resultados dos fatores de conversão para todos os meios utilizados nos estudos cinéticos realizados. Observando a Tabela 27 é possível notar que o meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores suplementado com 6 g/L de extrato de levedura apresentou o segundo maior índice de conversão de substrato em biomassa (2,68) e o maior fator de conversão de substrato em produto (1,09), porém o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores suplementado com 6 g/L de sulfato de amônio apresentou resultado semelhante (1,05) para o fator de conversão do substrato em produto, logo o meio contendo suco de caju com 50 g/L adicionado de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio apresentou resultados satisfatórios com a vantagem de utilizar um meio de cultura e fonte de nitrogênio de baixo custo. Pode-se observar também que o meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e suplementado com o extrato de levedura apresentou o maior índice de conversão de substrato em biomassa (2,72) e o segundo menor índice de conversão de substrato em produto (0,85), logo podemos concluir que o

microrganismo utilizou o substrato mais para seu crescimento e manutenção celular do que para produção de ácido láctico. Isso pode ser observado também nas Figuras 15, 16 e 17, que apresentam os gráficos para cada fator de conversão e os meios utilizados nos estudos cinéticos realizados.

Tabela 28. Fatores de conversão para os estudos cinéticos realizados com os meios contendo suco de caju clarificado variando a concentração de açúcares redutores e suplementado com sulfato de amônio e os meios contendo suco de caju clarificado e sintético suplementado com extrato de levedura para cultivo de *Lactobacillus casei* B-442 a 37°C e ph 6,5.

Meios	Y_{x/s}	Y_{p/x}	Y_{p/s}
suco de caju clarificado com 60 g/L A.R + sulfato de amônio 7,2 g/L	1,66	34,25	0,78
suco de caju clarificado com 50 g/L A.R+ sulfato de amônio 6,0 g/L	1,81	36,92	1,05
suco de caju clarificado com 40 g/L A.R+ sulfato de amônio 4,8 g/L	1,80	24,65	1,05
suco de caju clarificado com 30 g/L A.R+ sulfato de amônio 3,6 g/L	1,47	21,70	0,97
suco de caju clarificado com 20 g/L A.R+ sulfato de amônio 2,4 g/L	1,09	20,35	0,92
suco de caju clarificado com 50 g/L A.R + extrato de levedura 6 g/L	2,72	18,41	0,85
meio sintético com 50g/L + extrato de levedura 6 g/L	2,68	19,50	1,09

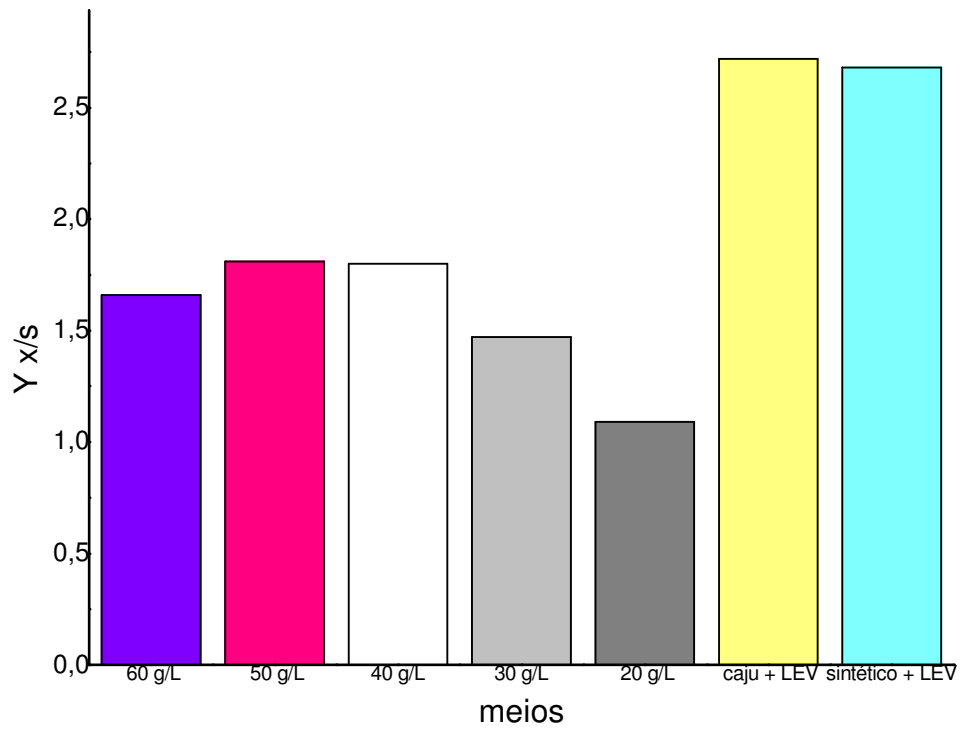


Figura 14. Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) para os meios contendo suco de caju clarificado com 60, 50, 40, 30 e 20 g/L de açúcares redutores, para o suco de caju clarificado 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura e meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura.

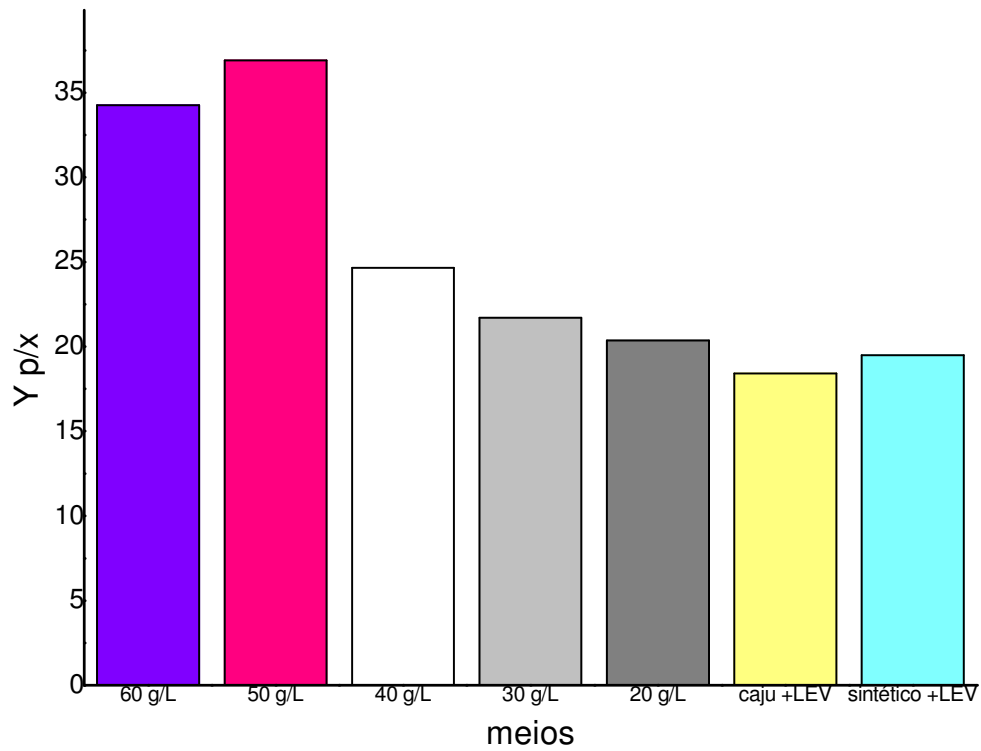


Figura 15. Razão de produção do produto e biomassa produzida ($Y_{p/x}$) para os meios contendo suco de caju clarificado com 60, 50, 40, 30 e 20 g/L de açúcares redutores, para o suco de caju clarificado 50 g/L suplementado com extrato de levedura e meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura.

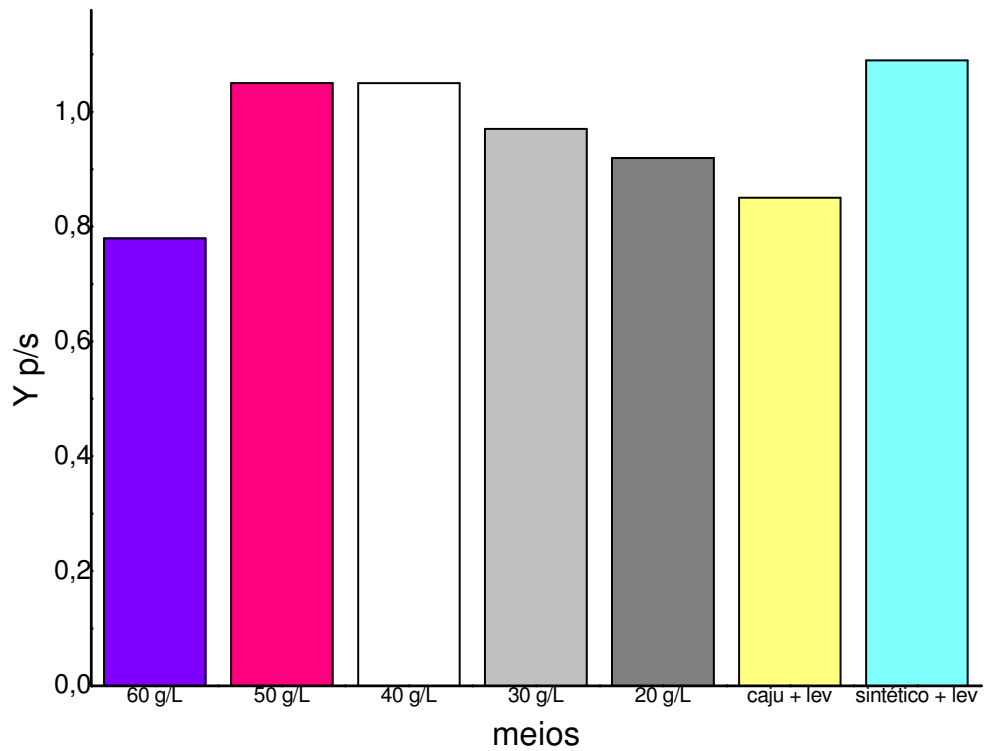


Figura 16. Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) para os meios contendo suco de caju clarificado com 60, 50, 40, 30 e 20 g/L de açúcares redutores, para o suco de caju clarificado 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura e meio sintético contendo 50 g/L suplementado com extrato de levedura.

5 CONCLUSÃO

O suco de caju clarificado combinado com sulfato de amônio, que é uma fonte de nitrogênio inorgânica, mostrou-se uma alternativa eficiente e viável, apresentando baixo custo e sendo adequado ao crescimento do *Lactobacillus casei* B-442 e à produção de ácido láctico.

As condições otimizadas para o crescimento e produção de ácido láctico utilizando o suco de caju clarificado foram: pH 6,5, temperatura de 37°C, meio de cultura com a concentração de 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio.

O estudo cinético realizado variando concentrações de açúcares redutores apresentou os melhores resultados de rendimento e produtividade, com o meio contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de sulfato de amônio.

O segundo estudo cinético realizado utilizando o meio sintético e suco de caju clarificado, ambos com 50 g/L de açúcares redutores e suplementados com 6 g/L de extrato de levedura, apresentou o meio sintético suplementado com o extrato de levedura, como o melhor substrato e os melhores resultados para rendimento e produtividade em ácido láctico, e fatores de conversão de substrato em produto (1,09) além de apresentar o menor tempo de fermentação (13 horas), porém, o suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores suplementado com sulfato de amônio apresentou resultados semelhantes quando comparado com o meio sintético, com a vantagem de ser de baixo custo, diminuindo o desperdício da matéria-prima e contribuindo para o meio ambiente.

O suco de caju apresentou-se como meio favorável ao crescimento do *Lactobacillus casei* B-442 principalmente no que diz respeito à riqueza de açúcares, vitaminas, aminoácidos e sais minerais necessários para o desenvolvimento deste microrganismo, que possui grandes exigências nutricionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALONSO, J.L; GULLÓN, B; YÁÑEZ, R; PARAJÓ, J.C. L- lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech. 2006. 12. 018.

ARASARATNAM, V; SENTHURAN, A; BALASUBRAMANIAN, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Enzyme and Microbial 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.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S; WRIGHT, A; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3 ed, p. 19-85, 2004.

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 Food Engineering**, v. 66 , p. 413 – 417, 2005.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities 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.

BUSTOS, G; MOLDE, A.B; ALONSO, J. L; VÁZQUEZ, M. Optimization of D- lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. **Food Microbiology**, v. 21, p. 143 – 148, 2004.

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.

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

DATTA, R; TSAI, S; BONSIGNORE, P; MOON, S; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivates. **Microbiology Reviews**, v.16, p. 221-231, 1995.

DERMICI, A; POMETTO, A.L; JOHNSON, K. E. Evaluation of biofilm reactor solid support for mixed-culture lactic acid production. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 728-733, 1993.

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; KOIDE, M; HIRATA, M;TAKANASHI, H; HANO, T. Development of a continuous electro dialysis fermentation system for production of lactic acid from *Lactobacillus rhamnossus*. **Process Biochemistry** ,v. 40, p.1033-1036, 2005.

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.

HAHN – HÄGERDAL, B; HOFVENDAHL, K. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87 – 1007, 2000.

HAULY, M. C. O; OLVEIRA, A. S; OLIVEIRA, A.R. Produção láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, p. 133-142, 2003.

HIRATA, M.; GAO, M.T.; TOORISAKA, E.; TAKANASHI, F.; HANO, T. Production of lactic acid by continuous electro-dialysis 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 of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 1409-1415, 2007b.

HOTZAMANIDIS, C; SKARACIS, G; ROUKAS, T. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p. 441 – 448, 2002.

HUJANEN, M; LINKO, Y, Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+) – lactic acid production by *Lactobacillus casei* . **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 307 – 313, 1996.

HUJANEN, M; LINKO, S; LINKO, Y.Y; LEISOLA, M. Optimization of media and cultivation conditions for L(+) – lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 126-130, 2001.

IDRIS, A; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1117 – 1123, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed., v. 1, São Paulo, 1985. 371p.

JOHN, R. P; NAMPOOTHIRI, K. M; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 524 – 534, 2007.

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.

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

MAHER, M., ROUX, G. AND DAHHOU, B. A Method for Estimation the State Variables and Parameters of Fermentation System. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 63, p. 153-159, 1995.

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.

MAIA, G. A.; SOUSA FILHO, M. S. M; FIGUEREDO, R. W; BRASIL, I. M; Caracterização química de pedúnculos de diferentes clones de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale, L*). **Revista Ciência Agronômica**, v.35, p. 272-278, 2004.

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.

NAMPOOTHIRI, M; PANDEY, A; JOHN, R. P. Solid – state fermentation for L- lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 759 – 763, 2006.

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

PAIVA, F.F. A.; GARRUTTI, D. S.; SILVA NETO, R.M. Aproveitamento industrial do caju. Fortaleza: Embrapa agroindústria Tropical/ SEBRAE-CE, 2000. **Documentos**, 38, p. 37-39.

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.

RASHID, R. **Optimization and modeling of lactic acid production from pineapples wastes**. 2008. 238f. Faculdade de Química e Engenharia de Recursos Naturais. Universidade Tecnológica da Malásia, 2008.

ROCHA, M. V. P; BARRETO, R. V. G; MELO, V. M. M; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI 008. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, DOI 10.1007/s12010-008-8459, 2009.

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.

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.

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.

SENTHURAN, A; SENTHURAN, V; HATTI – KAUL, R; MATTIASSON, B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **Journal of Biotechnology**, v.73. p. 61 – 70, 1999.

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

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.

SRIVASTAVA, A; NARAYANAN, N; ROYCHOUDHURY, P. K. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.7, p.168-179, 2004.

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

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.

TACHIBANA, T; SHINDO, S. Production of L- lactic acid from spent grain, a by – product of beer production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, p. 347 – 351, 2004.

TÉLLEZ – LUIS, S.J; MOLDES, A. B; ALONSO, J. L; VÁZQUEZ, M. Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* through response surface methodology. **Food Microbiology and Safety**, v. 68, p. 1454 – 1458, 2003.

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.

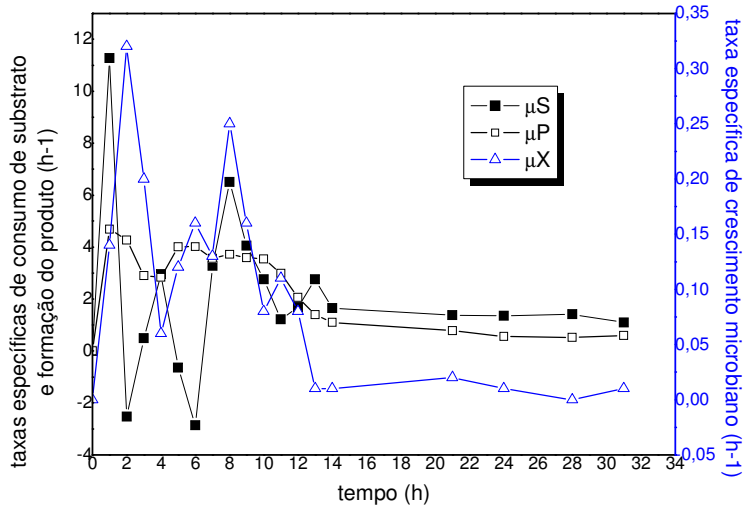
WILSON, S. D; HORNE, D. W. Use of Glycerol-Cryoprotected *Lactobacillus casei* for Microbiological Assay of Folic Acid. **Clinical Chemistry**, v.28, p. 1198-1200, 1982.

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.

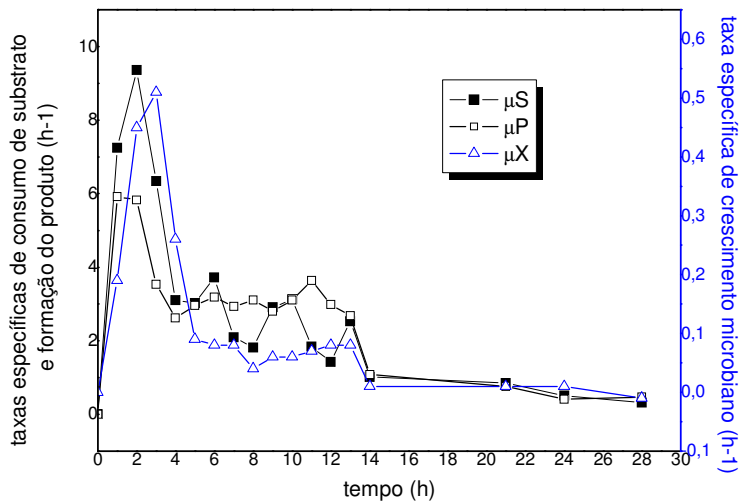
ZHANG, S; XU, G; CHU, J; ZHUANG, Y; WANG, Y. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERC 0401. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 189-197, 2008.

ANEXOS

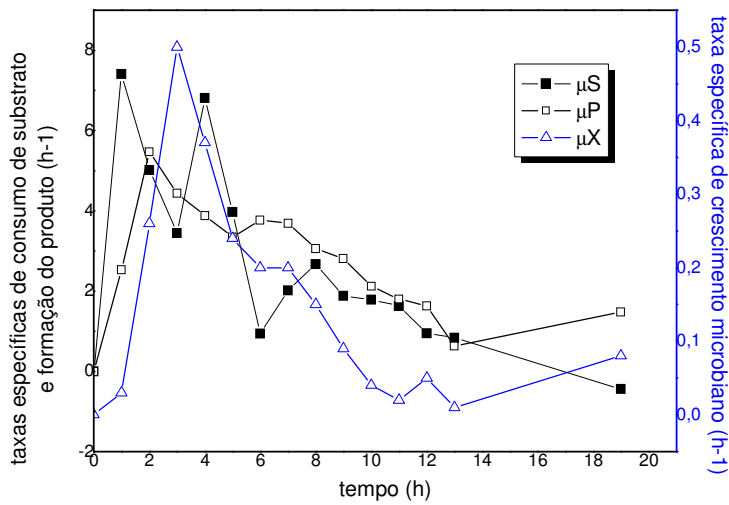
Anexo A. Taxas específicas para o consumo de substrato, crescimento microbiano e formação do produto no meio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores.



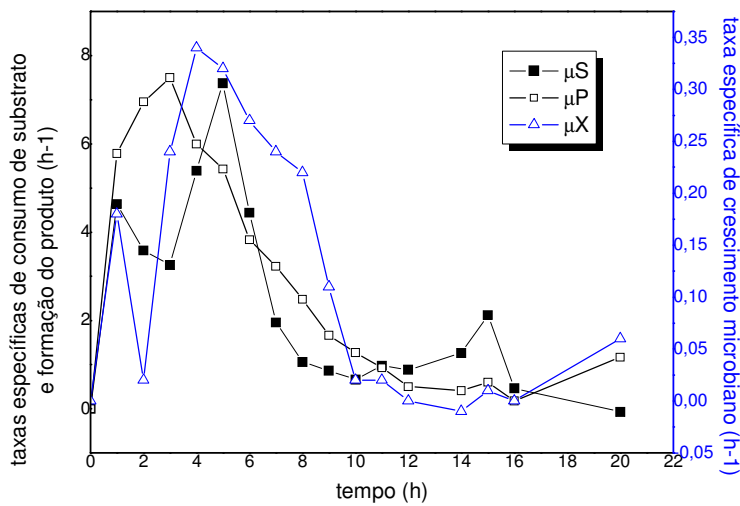
Anexo B. Taxas específicas para o consumo de substrato, crescimento microbiano e formação do produto no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores.



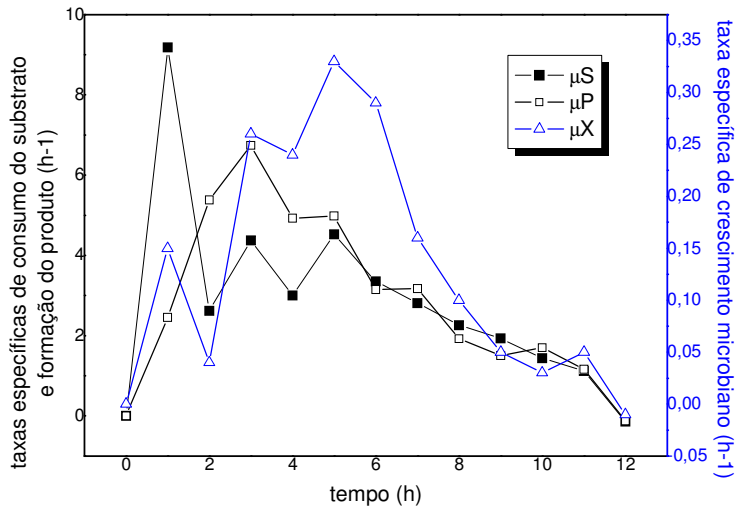
Anexo C. Taxas específicas para o consumo de substrato, crescimento microbiano e formação do produto no meio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores.



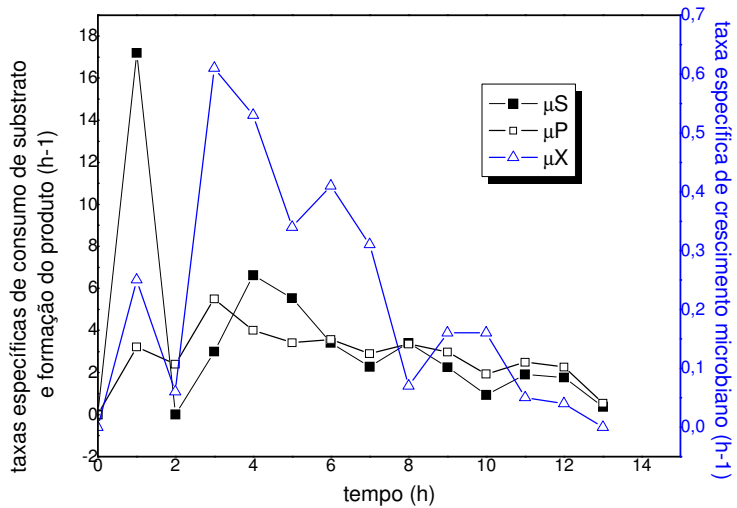
Anexo D Taxas específicas para o consumo de substrato, crescimento microbiano e formação do produto no meio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores.



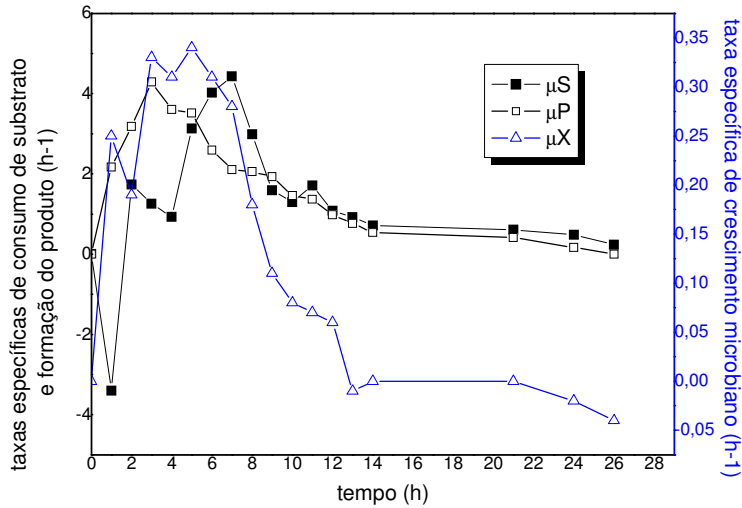
Anexo E. Taxas específicas para o consumo de substrato, crescimento microbiano e formação do produto no meio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores.



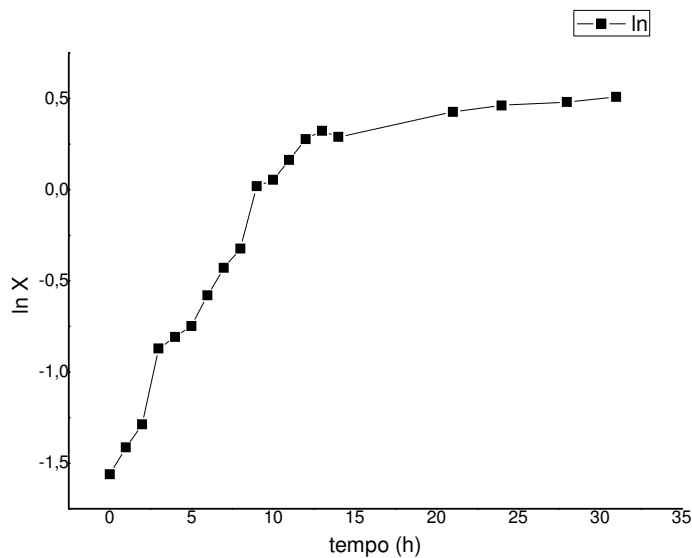
Anexo F. Taxas específicas para o consumo de substrato, crescimento microbiano e formação do produto no meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores suplementado com extrato de levedura.



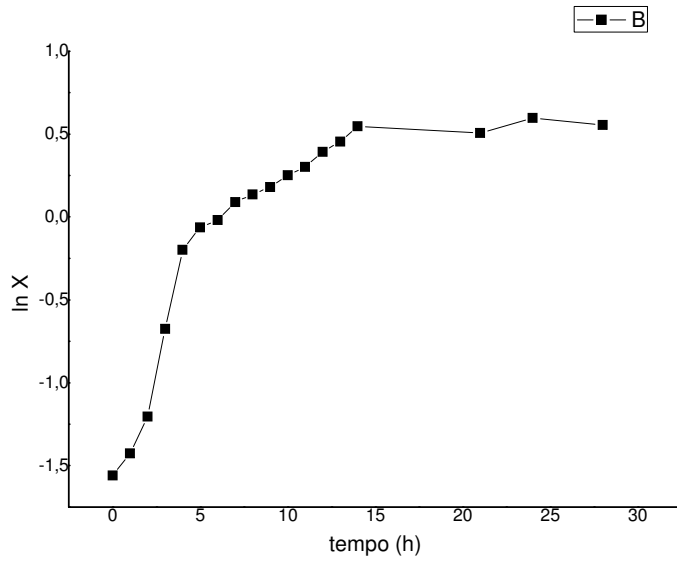
Anexo G.. Taxas específicas para o consumo de substrato, crescimento microbiano e formação do produto no meio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e suplementado com 6 g/L de extrato de levedura.



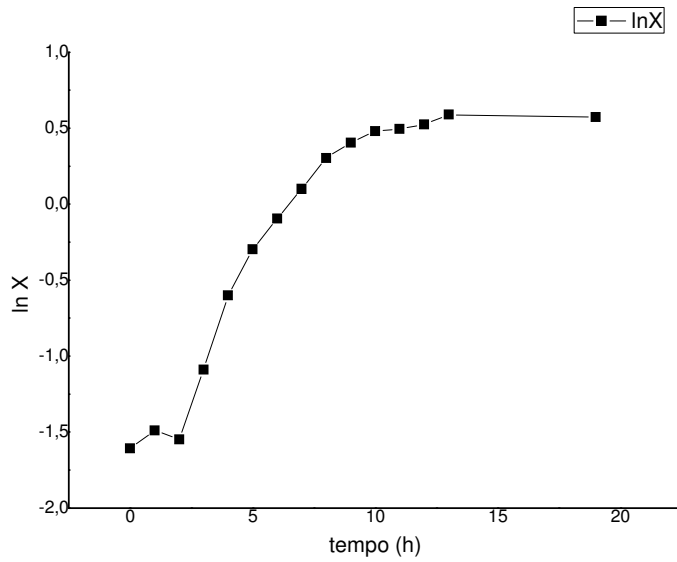
Anexo H. Gráfico $\ln X$ x tempo do ensaio utilizando o suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio.



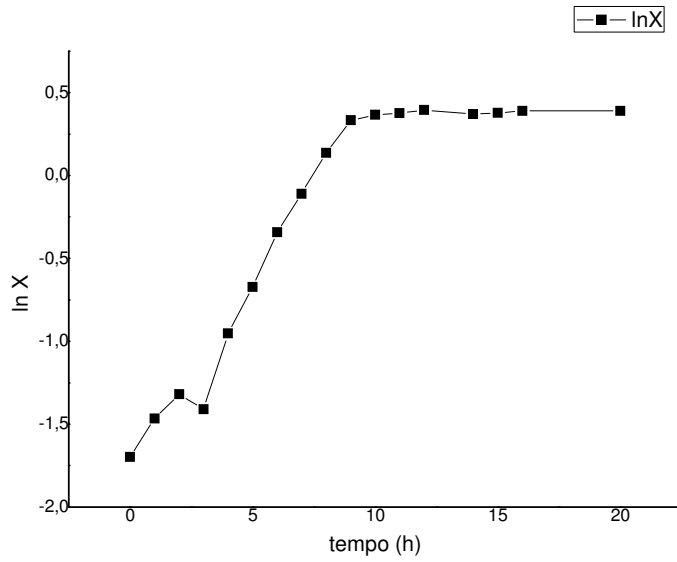
Anexo I. Gráfico $\ln x$ tempo do ensaio utilizando o suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de sulfato de amônio.



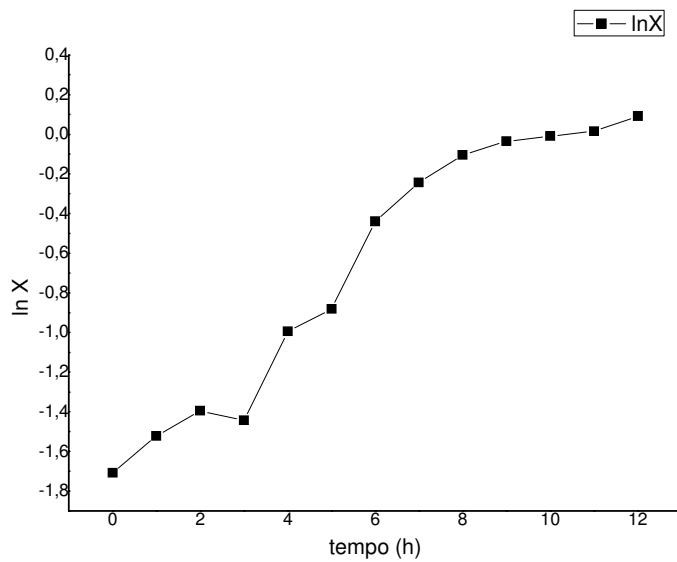
Anexo J. Gráfico $\ln x$ tempo do ensaio utilizando o suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de sulfato de amônio.



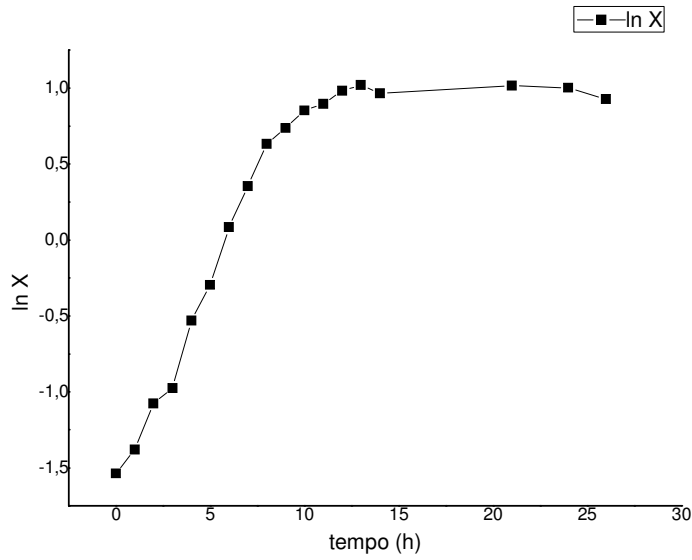
Anexo L. Gráfico $\ln X$ x tempo do ensaio utilizando o suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato de amônio.



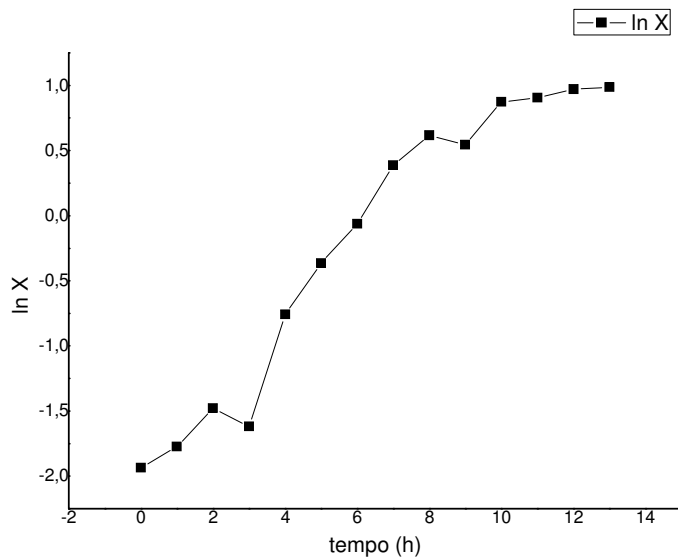
Anexo M. Gráfico $\ln X$ x tempo do ensaio utilizando o suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 2,4 g/L de sulfato de amônio.



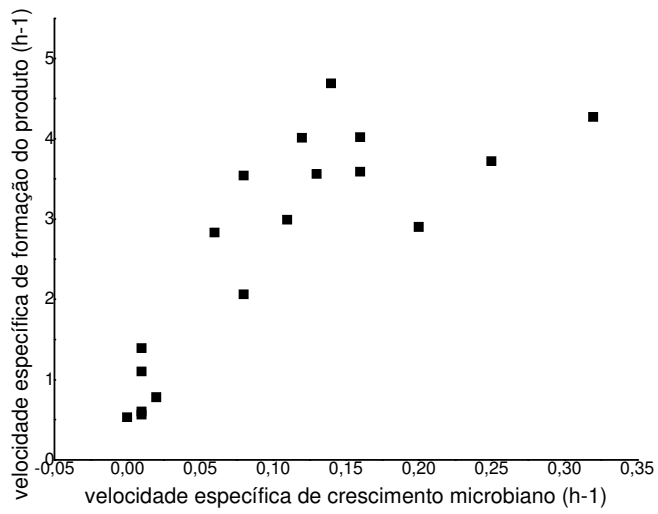
Anexo N. Gráfico $\ln x$ tempo do ensaio utilizando o suco de caju clarificado com 50g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de extrato de levedura.



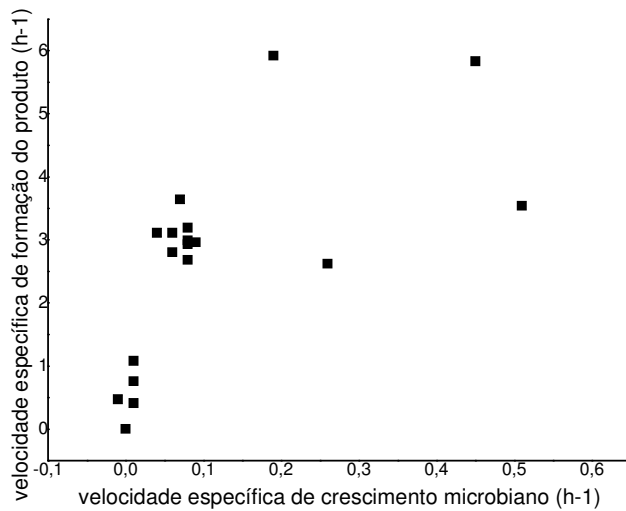
Anexo O. Gráfico $\ln x$ tempo do ensaio utilizando meio sintético com 50g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de extrato de levedura.



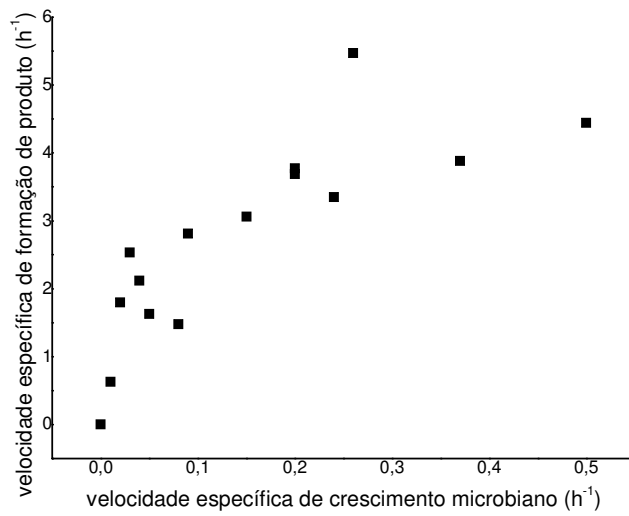
Anexo P. Gráfico μ_X x μ_P do ensaio contendo suco de caju clarificado com 60 g/L de açúcares redutores e 7,2 g/L de sulfato de amônio.



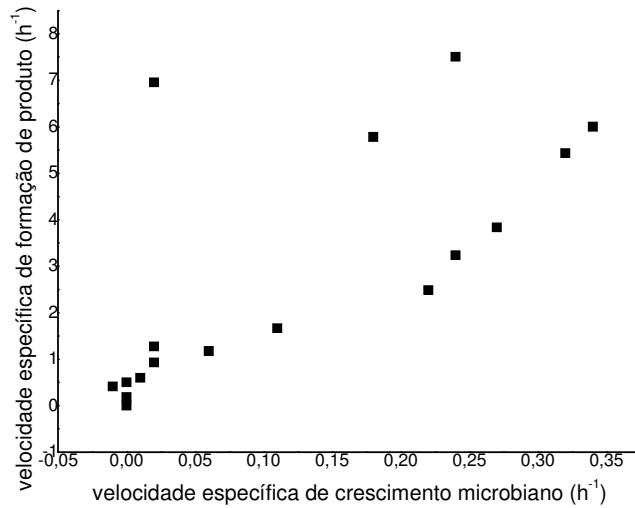
Anexo Q. Gráfico μ_X x μ_P do ensaio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de sulfato de amônio.



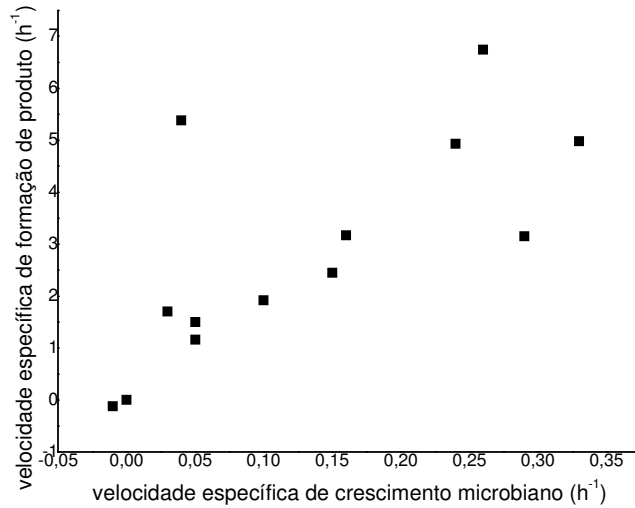
Anexo R. Gráfico μ_X x μ_P do ensaio contendo suco de caju clarificado com 40 g/L de açúcares redutores e 4,2 g/L de sulfato de amônio.



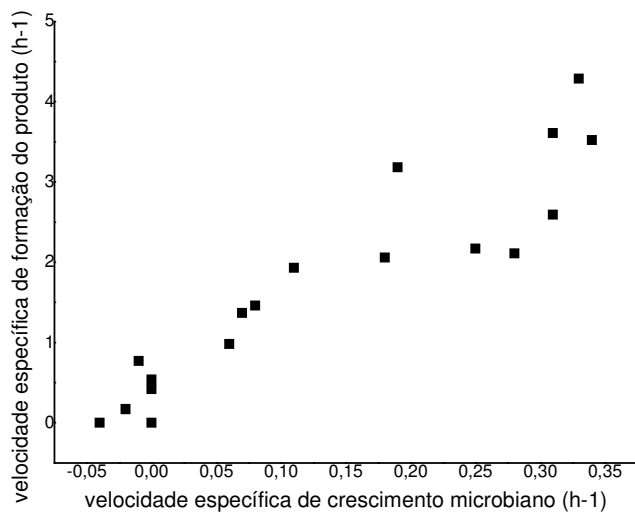
Anexo S. Gráfico μ_X x μ_P do ensaio contendo suco de caju clarificado com 30 g/L de açúcares redutores e 3,6 g/L de sulfato de amônio.



Anexo T. Gráfico μ_X x μ_P do ensaio contendo suco de caju clarificado com 20 g/L de açúcares redutores e 2,4 g/L de sulfato de amônio.



Anexo U. Gráfico μ_X x μ_P do ensaio contendo suco de caju clarificado com 50 g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de extrato de levedura.



Anexo V. Gráfico μ_X x μ_P do ensaio do meio sintético contendo 50 g/L de açúcares redutores e 6,0 g/L de extrato de levedura.

