



Universidade Federal do Ceará
Departamento de Tecnologia de Alimentos
Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Maria Cristiane Rabelo

**APROVEITAMENTO DO PEDÚNCULO DO CAJU PARA SÍNTESE DE
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS.**

Fortaleza-Ceará
2008

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

MARIA CRISTIANE RABELO

**APROVEITAMENTO DO PEDÚNCULO DO CAJU PARA SÍNTESE DE
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS.**

FORTALEZA
2008

MARIA CRISTIANE RABELO

**APROVEITAMENTO DO PEDÚNCULO DO CAJU PARA SÍNTESE DE
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues

**FORTALEZA
2008**

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

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

Maria Cristiane Rabelo

Dissertação aprovada em 22 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo
Universidade Federal do Ceará - UFC

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

Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais Airton e Socorro, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me abençoar e me proteger todos os dias.

Aos meus pais, Airton e Socorro, pela educação, carinho e dedicação ao longo de minha vida.

Aos meus irmãos, Crisóstomo, Crisanto, Júnior e Cláudio, pelo apoio e compreensão.

A todos os meus familiares, que torcem pelo meu sucesso.

Ao Benjamim, pela compreensão, carinho e incentivo e por estar sempre ao meu lado me proporcionando momentos de felicidade.

Agradeço imensamente a minha orientadora professora Dra. Sueli Rodrigues, pelos valiosos ensinamentos, apoio, paciência, dedicação, confiança, por seu incentivo constante e amizade.

Aos professores Dr. Raimundo Wilane de Figueiredo, Dra. Gorete Ribeiro de Macedo, que gentilmente aceitaram o convite de participar desta banca de defesa de dissertação, contribuindo assim, para o enriquecimento deste trabalho.

À professora Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira, que aceitou participar como suplente da banca examinadora.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Talita, Anita, Mariana, Alexandre, Anaísa, Luiz Carlos, Simone, Jéssica, Mayra e Thatyane, pela amizade, apoio e pela ótima convivência.

À Cláudia Fontes, minha eterna gratidão pela colaboração na realização dos experimentos e pela amizade.

À Soraya Sancho pela amizade e valiosa colaboração na elaboração desta dissertação.

Aos colegas da turma de mestrado, Mirela, Anália, Cyntia, Ana Amélia, Afrânio, Aliciane, Aline, Andréa, Eli, Germana, Luiza, Mauro, Michele, Rodrigo, Wedja, Érica e Virlane pela amizade e companheirismo.

A todos os professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos, colaboração e amizade durante o curso de Mestrado.

Ao secretário do curso de Mestrado, Paulo Mendes, por sua dedicação e ajuda decorrer do curso.

À Universidade Federal do Ceará, pela possibilidade de cursar o Mestrado e por tudo de bom que ele vier a me proporcionar.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo durante todo o curso e pelo apoio financeiro.

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

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

“Nenhuma mente que se abre para uma nova idéia voltará a ter o tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

O *Leuconostoc mesenteroides* B742 produz a enzima dextrana-sacarase em meio sintético contendo sacarose (fonte de carbono), fonte de nitrogênio e sais. Esta enzima catalisa a formação de dextrana quando em meio contendo sacarose como único substrato. Entretanto, quando em meio contendo um aceptor (maltose, frutose, glicose ou outro açúcar simples) como substrato predominante e sacarose como segundo substrato, a enzima produz oligossacarídeos prébióticos. Estes carboidratos não são digeridos por humanos e ao chegarem no intestino grosso são metabolizados pelas bifidobactérias e lactobacilos, ali presentes, estimulando o seu crescimento. A maioria dos trabalhos publicados sobre a síntese de oligossacarídeos com dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* são relativos à linhagem B512F e utilizam substratos sintéticos. O caju, largamente cultivado no Ceará, possui castanha (verdadeiro fruto) e pedúnculo (pseudofruto) que é fonte de vitamina C. Considerando-se que o pedúnculo corresponde a 90% do peso do caju, calcula-se que o país produza cerca de 1,5 milhão de toneladas desse produto. No entanto, apenas 5% desse total é aproveitado industrialmente ou para consumo *in natura*, sendo grande parte perdida no campo. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo o aproveitamento do pedúnculo como substrato para a síntese de oligossacarídeos prebióticos pela reação do aceptor com a enzima dextrana-sacarase, obtida via processo fermentativo a partir do *Leuconostoc mesenteroides* B742 no suco de caju clarificado *in natura*. A substituição parcial do extrato de levedura por sulfato de amônio como fonte de nitrogênio foi também avaliada. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o suco de caju clarificado pode ser empregado como uma alternativa de substrato de baixo custo para o crescimento do *Leuconostoc mesenteroides* B742 e para a produção de oligossacarídeos prebióticos via síntese enzimática. A enzima bruta apresentou estabilidade superior no suco de caju quando comparada ao meio sintético, tornando este substrato bastante interessante do ponto de vista industrial, uma vez que a purificação da enzima é uma das etapas mais caras em processos enzimáticos. A substituição parcial do extrato de levedura por sulfato de amônio na produção da enzima se mostrou eficaz não causando perdas na produção da enzima.

Palavras-chave: *Leuconostoc mesenteroides* B742, dextrana-sacarase, suco de caju clarificado, sulfato de amônio.

ABSTRACT

Leuconostoc mesenteroides B742 produces the enzyme dextransucrose in a medium containing sucrose (carbon source), a nitrogen source and mineral salts. This enzyme catalyses dextran synthesis when the only carbon source is sucrose. When acceptors (maltose, fructose, glucose or other simple sugar) are present as the main substrate and sucrose is the second one, the enzyme synthesizes prebiotic oligosaccharides. These carbohydrates are not digested by humans and reach the large intestine where they are metabolized by bifidobacteria and lactobacilli, the intestine endogenous microbiota, increasing their growth. The most published papers about oligosaccharides synthesis using dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* are related to the strain B512F and the synthesis is carried out using synthetic substrates. The cashew tree, largely grown in Ceará state, has a peduncle (pseudofruit) which is wasted. Considering that the peduncle corresponds to 90 % of the fruit weight, its annual estimated production is about 1,5 millions tons. However, only 5% of this production is industrially used or consumed *in natura*, being large amounts wasted in the field. This work aimed to the study of the prebiotic oligosaccharide synthesis through the acceptor reaction with dextransucrase enzyme from *Leuconostoc mesenteroides* B742 *in natura* clarified cashew apple juice. The partial substitution of yeast extract by ammonium sulfate as nitrogen source was also investigated. According to the results obtained, the clarified cashew apple juice can be used as low cost alternative substrate to grow *L.mesenteroides* B742 and to produce prebiotic oligosaccharide through enzyme synthesis. The crude enzyme showed higher stability in the clarified cashew apple juice when compared to the synthetic medium, making this substrate interesting for industrial applications because enzyme purification protocols are one of the most expensive steps in enzyme process. The partial substitution of yeast extract by ammonium sulfate also showed technical viability without enzyme yield losses.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides* B742, dextransucrase, clarified cashew apple juice, ammonium sulfate.

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Oligossacarídeos prebióticos comercialmente disponíveis .	23
2	Composição química e físico-química do pedúnculo do caju.	33
3	Meio padrão otimizado	35
4	Fontes de nitrogênio utilizadas.	38
5	Planejamento experimental para otimização do meio de cultura.	39
6	Planejamento experimental para otimização da atividade da enzima dextrana-sacarase.	40
7	Planejamento experimental para investigar a estabilidade da enzima dextrana-sacarase em meio sintético.	41
8	Planejamento experimental para a síntese enzimática dos oligossacarídeos prebióticos.	43
9	Composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado.	51
10	Crescimento microbiano nas diferentes fontes de nitrogênio.	52
11	Planejamento experimental e resultados obtidos de pH, biomassa e dextrana	54
12	Efeitos estimados para a biomassa.	54
13	Análise de variância para a biomassa (Eq. 4).	55
14	Taxas máximas de crescimento específico para a otimização do meio de cultura	60
15	Planejamento experimental e resultados obtidos de atividade enzimática em 30 e 60 minutos	66
16	Efeitos estimados para a atividade enzimática em 30 e 60 minutos	66
17	Análise de variância para a atividade enzimática em 30 minutos (Eq. 13)..	67
18	Análise de variância para a atividade enzimática em 60 minutos (Eq. 14)..	67
19	Atividade enzimática obtida em pH 6,5 nas temperaturas de 30 e 35°C.	70
20	Planejamento experimental e resultados obtidos de atividade enzimática nos intervalos de tempo de 0,5 e 1 hora.	71
21	Planejamento experimental e resultados obtidos de atividade enzimática nos intervalos de tempo de 2 e 3 horas	71
22	Efeitos estimados para a atividade enzimática no período de 0,5 a 2 horas	72
23	Análise de variância para a atividade enzimática em 0,5 hora (Eq.15).	73
24	Análise de variância para a atividade enzimática em 1 hora (Eq.16)	73

25	Análise de variância para a atividade enzimática em 2 horas (Eq.17).	73
26	Planejamento experimental e resultados obtidos de oligossacarídeos prebióticos, dextrana, e rendimentos em oligossacarídeos e dextrana	80
27	Planejamento experimental e resultados obtidos de açúcares redutores e totais consumidos	80
28	Efeitos estimados para concentração e rendimento de oligossacarídeos e dextrana.	80
29	Efeitos estimados para os açúcares redutores consumidos e açúcares totais consumidos	81
30	Análise de variância para os oligossacarídeos prebióticos (Eq. 18)	82
31	Análise de variância para a dextrana (Eq. 19).	82
32	Análise de variância para rendimento em oligossacarídeos (Eq. 20)	83
33	Análise de variância para rendimento em dextrana (Eq. 21)	83
34	Análise de variância para os açúcares redutores consumidos (Eq. 22)	83
35	Análise de variância para os açúcares totais consumidos (Eq. 23)	83

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos. . . .	24
2	Concentração de biomassa obtida com as diferentes fontes de nitrogênio testadas conforme a Tabela 10.	53
3	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio controle; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio controle. . . .	56
4	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 1; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 1.	56
5	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 2; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 2.	56
6	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 3; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 3.	57
7	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 4; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 4.	57
8	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 5; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 5.	57
9	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 6; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 6.	58
10	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 7; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 7.	58
11	a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 8; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 8.	58
12	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 9; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 9.	59
13	(a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 10; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 10.	59
14	Superfície de resposta para biomassa obtida em função da concentração de extrato de levedura e de sulfato de amônio	61
15	Perfil de biomassa, pH (a), atividade enzimática e proteína (b) durante a fermentação no meio otimizado contendo sulfato de amônio sem controle de pH.	62
16	Perfil de biomassa, pH (a), atividade enzimática e proteína (b) durante a fermentação no meio controle sem controle de pH	63

17	Perfil de biomassa, atividade enzimática e proteína durante a fermentação no meio otimizado contendo sulfato de amônio em pH controlado	64
18	Superfície de resposta para a atividade enzimática em 30 minutos	68
19	Superfície de resposta para a atividade enzimática em 60 minutos	69
20	Superfície de resposta para a estabilidade enzimática em 0,5 hora	74
21	Superfície de resposta para a estabilidade enzimática em 1 hora.	74
22	Superfície de resposta para a estabilidade enzimática em 2 horas	75
23	Estabilidade da enzima dextrana-sacarase em meio sintético durante 3 horas.	76
24	Estabilidade da enzima dextrana-sacarase em suco de caju durante 48 horas (pH 6,5).	78
25	Oligossacarídeos prebióticos obtidos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.	84
26	Dextrana obtida em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.	85
27	Rendimento em oligossacarídeos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.	86
28	Rendimento em dextrana em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.	86
29	Açúcares redutores consumidos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores iniciais. . .	87
30	Açúcares totais consumidos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores iniciais.	88
31	Oligossacarídeos detectados através de cromatografia de camada delgada.	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Alimentos funcionais	19
2.2	Probióticos	20
2.3	Oligossacarídeos prebióticos	21
2.4	Tipos de oligossacarídeos prebióticos	23
2.5	Propriedades dos oligossacarídeos prebióticos	25
2.6	Efeitos benéficos atribuídos aos oligossacarídeos prebióticos	26
2.7	Aplicações dos oligossacarídeos prebióticos	27
2.8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B742	28
2.9	Dextrana-sacarase	28
2.10	Mecanismo de síntese de oligossacarídeos	29
2.11	Caju	30
2.12	Composição química do pedúnculo do caju	32
2.13	Suco de caju	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Obtenção do microrganismo	35
3.2	Ativação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B742 liofilizado	35
3.3	Ativação do microrganismo congelado	36
3.4	Obtenção do suco de caju	36
3.5	Caracterização físico-química do suco de caju clarificado	37
3.6	Otimização do meio de cultura para a produção da enzima dextrana-sacarase	37
3.7	Otimização das condições da determinação da atividade da enzima dextrana-sacarase	40
3.8	Estabilidade da enzima dextrana-sacarase quanto ao pH e temperatura	41
3.9	Fermentação do suco de caju para produção da enzima dextrana-sacarase	42
3.10	Síntese enzimática dos oligossacarídeos prebióticos	42
3.11	Métodos Analíticos	45
3.11.1	pH	45
3.11.2	Determinação de açúcares redutores	45
3.11.3	Determinação de proteínas	46
3.11.4	Composição mineral do suco de caju	46
3.11.5	Determinação do crescimento microbiano	47
3.11.6	Determinação da Dextrana	47
3.11.7	Determinação da atividade enzimática	47
3.11.8	Detecção de oligossacarídeos através de cromatografia de camada delgada (CCD)	49
3.12	Análise dos dados	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Caracterização físico-química do suco de caju clarificado	51
4.2	Otimização do meio de cultura para a produção da enzima dextrana-sacarase	52

4.3	Otimização das condições de determinação da atividade da enzima dextrana-sacarase	65
4.4	Estabilidade da enzima dextrana-sacarase quanto ao pH e temperatura	71
4.5	Síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos	79
5	CONCLUSÕES	90
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

Recentemente o uso de alimentos funcionais, em especial aqueles contendo bifidobactérias e lactobacilos denominados (probióticos), tem crescido bastante. Estas bactérias residem naturalmente no intestino humano e de animais. A esta microbiota intestinal é atribuída a melhoria da intolerância a lactose, melhoria do sistema imunológico, redução de enzimas mutagênicas, tais como: beta-glucuronidase e nitroredutase (CHUNG e DAY, 2002), além da síntese de vitaminas do complexo B. Estes microrganismos se destacam por metabolizar oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 10, e esta característica tem sido considerada como fator chave para o estabelecimento de efeitos de saúde. Entretanto, para serem efetivos, os alimentos probióticos devem alcançar o intestino grosso.

Alguns carboidratos têm sido denominados prebióticos por não serem metabolizados no estômago e no intestino delgado, sendo capazes de chegar ao intestino grosso (CHUNG e DAY, 2004). Estes carboidratos não são digeridos por humanos e ao chegarem no intestino grosso são metabolizados pelas bifidobactérias e lactobacilos, ali presentes, estimulando o seu crescimento.

Oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 10 são extremamente importantes para várias aplicações nutricionais e farmacêuticas. A enzima dextran-sacarase é uma transglicosidase que pode ser obtida a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* B742 em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Esta enzima pode ser utilizada para a síntese de dextrana em meio contendo sacarose como substrato. Entretanto, quando além de sacarose, um acceptor é também utilizado como segundo substrato, parte das unidades de glicose proveniente da quebra da sacarose promovida pela enzima é desviada da cadeia de dextrana sendo incorporadas neste segundo substrato, formando oligossacarídeos de interesse técnico (reação do acceptor). Quando maltose é utilizada como acceptor, o principal produto desta reação são os isomalto-oligossacarídeos, que podem ser aplicados na indústria de alimentos como adoçantes não cariogênicos (MIYAKE *et al*, 1985) e agentes estabilizantes de bebidas (HIGASHIMURA *et al*,. 2000) . Quando

glicose ou frutose são utilizadas como aceptores há formação de gluco-oligossacarídeos e fruto-oligossacarídeos, respectivamente, que assim como os malto-oligossacarídeos estimulam o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos inibindo o crescimento de microrganismos patógenos (*Salmonella* e *E.coli*).

O *Leuconostoc mesenteroides* B742, é um microrganismo não patogênico e seguro do ponto de vista alimentar. Esta linhagem mostrou boa produtividade para produção de oligossacarídeos em meio sintético utilizando-se maltose como acceptor (CHUNG e DAY, 2002). Entretanto esta linhagem é muito pouco estudada quando comparada com a linhagem *L.mesenteroides* B512F é industrialmente utilizada para obtenção de dextrana e dextrana-sacarase.

O caju é rico em glicose e frutose e, dessa forma, funciona como fonte de aceptores. Como o caju praticamente não apresenta sacarose, este carboidrato deve ser adicionado para indução da produção da enzima, que é de expressão extracelular, além da atuação como doador de glicose para síntese dos oligossacarídeos.

A utilização de substratos regionais visa o aproveitamento de matérias-primas regionais agrícolas. O caju é composto por 10% de castanha e 90% de pedúnculo. Dessas duas partes, o pedúnculo apresenta o menor aproveitamento (LIMA, 2008). Estima-se que as perdas chegam a 2 milhões de toneladas/ano de polpa de caju (CAVALCANTE, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo o aproveitamento do pedúnculo de caju como substrato para a síntese de oligossacarídeos prebióticos através da reação do acceptor com a enzima dextrana-sacarase, obtida via processo fermentativo a partir do *Leuconostoc mesenteroides* B742 no suco de caju clarificado *in natura*, proporcionando uma redução no custo do meio de cultura, a partir do aproveitamento de matérias-primas regionais e, através do desenvolvimento de tecnologias, processos e conhecimentos que viabilizem o uso eficiente de recursos e que permitam a redução de perdas de excedentes.

Deste modo, foram determinadas as condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da enzima dextrana-sacarase, além da avaliação da estabilidade da referida enzima quanto ao pH e temperatura em meio sintético e em suco de caju clarificado *in natura*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alimentos funcionais

A preocupação com relação à alimentação vem mudando muito nas últimas décadas. A nutrição continua desempenhando seu papel de fornecimento de nutrientes, mas o conceito de alimentos funcionais faz com que essa ciência se associe à medicina e ganhe dimensão extra no século XXI (SALGADO, 2001).

Os alimentos funcionais constituem hoje a prioridade de pesquisa na área de nutrição e tecnologia de alimentos, levando-se em conta o interesse do consumidor em alimentos mais saudáveis, que além de nutrir possam modelar o sistema fisiológico do organismo (BORTOLOZO e QUADROS, 2007). Um alimento funcional é similar em aparência a um alimento convencional, no entanto, tem sido modificado com a adição de ingredientes que fornecem efeitos adicionais à saúde.

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

Segundo SGARBIERI e PACHECO (1999), alimento funcional é qualquer alimento, natural ou preparado, que contenha uma ou mais substâncias, classificadas como nutrientes ou não nutrientes, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde, podendo retardar o estabelecimento de doenças crônico-degenerativas e melhorar a qualidade e a expectativa de vida das pessoas.

Os principais grupos biologicamente ativos atualmente conhecidos como ingredientes funcionais são as fibras solúveis e insolúveis, flavonóides, carotenóides, fitosteróis, fitostanóis, ácidos graxos (ômega 3 e ômega 6), prebióticos e probióticos (BELLO, 1995; TORRES, 2001). Na busca de novos alimentos funcionais, os

prebióticos têm sido estudados como ingredientes em vários alimentos, entre eles bebidas lácteas funcionais ou simbióticas (SILVA e STAMFORD, 2000).

O uso de alimentos funcionais, em especial aqueles contendo bifidobactérias e lactobacilos denominados probióticos, tem crescido bastante. Estas bactérias residem naturalmente no intestino humano e de animais. A esta microbiota intestinal é atribuída a melhoria da intolerância a lactose, melhoria do sistema imunológico, redução de enzimas mutagênicas, tais como: beta-glucoronidase e nitroreductase (CHUNG e DAY, 2002), além da síntese de vitaminas do complexo B. Estes microrganismos se destacam por metabolizar oligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 10, e esta característica tem sido considerada como fator chave para o estabelecimento de efeitos de saúde. Entretanto, para serem efetivos, os alimentos probióticos devem alcançar o intestino grosso.

2.2 Probióticos

A palavra “probiótico” deriva do grego e significa “para a vida” (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001). Embora o termo e a definição precisa de probiótico tenham origem nos anos 90, o interesse por microrganismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos (SCHREZENMEIR e VRESE, 2001).

Probióticos são definidos como microrganismos viáveis que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro por promoverem balanço da microbiota intestinal, sendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as espécies mais utilizadas como probióticos (FULLER, 1989).

Segundo o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Resolução RDC nº 2, de janeiro de 2002, entende-se por probióticos os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Esses microrganismos, notadamente algumas variedades de lactobacilos e bifidobactérias, fermentam a lactose, produzindo ácido láctico. Eles têm a capacidade de manterem-se vivos no produto fermentado e sobreviverem à passagem pelo trato gastrointestinal, fixando-se no intestino e trazendo melhorias no balanço da microbiota intestinal de indivíduos que consomem periodicamente esses produtos (SILVA, 2007).

Segundo GIBSON e FULLER (2000), para um microorganismo probiótico garantir efetividade, várias condições devem ser atendidas: não apresentar variação genética; ser estável; apresentar resistência ao ambiente ácido do estômago e a sais biliares; ter capacidade de proliferação, afinidade e sobrevivência no intestino; produzir metabólitos; fazer a modulação da atividade metabólica; a imunomodulação, além de ser seguro ou *Generally Regarded as Safe* (GRAS).

2.3 Oligossacarídeos prebióticos

De acordo com BURKERT (2003) oligossacarídeos são definidos como glicosídeos contendo entre três e dez unidades de monossacarídeos. Como eles são pequenos são prontamente hidrossolúveis e freqüentemente bastante doces (VERGARA, 2007).

São considerados prebióticos os oligossacarídeos resistentes, ou seja, carboidratos complexos de configuração molecular que os tornam resistentes à ação hidrolítica da enzima salivar e intestinal, atingindo o cólon intactos, com efeitos sobre a microbiota colônica, uma vez que ao chegarem ao intestino grosso são metabolizados pelas bifidobactérias e lactobacilos, ali presentes, estimulando o seu crescimento (BORGES, 2002; FAGUNDES e COSTA, 2003; CHUNG e DAY, 2004).

Segundo GIBSON e ROBERFROID (1995), os prebióticos são definidos como componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis (probióticos) no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a

multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado.

A funcionalidade dos alimentos prebióticos está relacionada a uma atuação direta com: aumento do tempo de esvaziamento do estômago; modulação do trânsito do trato gastrointestinal; diminuição de colesterol via adsorção de ácidos biliares e por meio de atuação indireta, modulando a fermentação microbiana pelo estímulo de bactérias bífidas responsáveis por aumento de SCFA (ácidos graxos de cadeia curta), diminuição de pH e diminuição na absorção da amônia (BORTOLOZO e QUADROS, 2007).

Segundo SILVA (2007), para um ingrediente alimentar ser classificado como um prebiótico é necessário:

- Não sofrer hidrólise e nem ser absorvido na parte superior do trato gastrointestinal;
- Ser um substrato seletivo para um número limitado de bactérias potencialmente benéficas ao cólon, que são estimuladas para crescerem e desenvolverem atividades metabólicas;
- Ser capaz de promover uma biota intestinal saudável e, como consequência, induzir efeitos no lúmen que beneficiem o hospedeiro.

Os oligossacarídeos são utilizados como novos ingredientes funcionais dos alimentos apresentando grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos. Oligossacarídeos de vários tipos são encontrados como componentes naturais de frutas, vegetais, leite e mel. Muitos destes compostos têm propriedades bifidogênicas. Os oligossacarídeos produzidos são maltooligosacarídeos, xilooligosacarídeos, gentiooligosacarídeos, soja-oligosacarídeos, palatinose, lactosacarose, glicosil sacarose e ciclodextrina (MAKINO, 2004).

2.4 Tipos de oligossacarídeos prebióticos

A maioria dos oligossacarídeos prebióticos estudados atualmente são produtos comerciais obtidos por hidrólise parcial, ácida ou enzimática, de polissacarídeos ou por reações de transglicosilação. Porém, eles também podem ser obtidos diretamente de sua fonte natural (vegetais, leite, parede celular de leveduras). (SILVA e NÖRNBERG, 2003). A Tabela 1 apresenta os oligossacarídeos com efeitos bifidogênicos que são produzidos comercialmente.

Os oligossacarídeos prebióticos são encontrados naturalmente em vegetais como alcachofra, raiz de chicória, cebola, alho, banana, aspargo, trigo, centeio e cevada. No entanto, as concentrações presentes são baixas, exigindo consumo extremamente elevado para obtenção dos efeitos fisiológicos desejados (PIMENTEL, *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Oligossacarídeos prebióticos comercialmente disponíveis (MUSSATTO e MANCILHA, 2007)

Composto	Estrutura Molecular^a
Ciclodextrinas	(Glu) <i>n</i>
Frutooligossacarídeos	(Fru) <i>n</i> -Glu
Galactooligossacarídeos	(Ga) <i>n</i> -Glu
Gentiooligossacarídeos	(Glu) <i>n</i>
Glicosilacarose	(Glu) <i>n</i> -Fru
Isomaltoligossacarídeos	(Glu) <i>n</i>
Isomaltulose (ou palatinose)	(Glu-Fru) <i>n</i>
Lactusacarose	Ga-Glu-Fru
Lactulose	Ga-Fru
Maltoligossacarídeos	(Glu) <i>n</i>
Rafinose	Ga-Glu-Fru
Oligossacarídeos de soja	(Ga) <i>n</i> -Glu-Fru
Xilooligossacarídeos	(Xil) <i>n</i>

^a Ga, galactose; Glu, glucose; Fru, frutose; Xil, xilose.

Os prebióticos abrangem também as frutanas, que incluem a inulina natural, inulina hidrolisada enzimaticamente ou oligofrutose (GIBSON e FULLER, 2000).

As diferenças químicas entre estes oligossacarídeos são o comprimento da cadeia, a composição de monossacarídeos, o grau de ramificação e a pureza (MUSSATTO e MANCILHA, 2007).

Dentre os oligossacarídeos destacam-se os frutooligossacarídeos (FOS), que são importantes principalmente por suas propriedades funcionais, mais do que pela sua doçura (PASSOS e PARK, 2006).

Os frutooligossacarídeos são formados por uma molécula de sacarose, com uma, duas ou três unidades de frutose unidas, mediante ligações $\beta(1-2)$ à molécula de sacarose. O grau de polimerização varia de 2 a 10 unidades, abreviados como GF2 (1-kestose), GF3 (nistose) e GF4 (frutosilnistose) (Figura 1). Estes oligossacarídeos derivados da sacarose são encontrados naturalmente em vegetais e plantas como alcachofra, raiz de chicória, dália, dente de leão, cebola, alho e banana. São chamados açúcares não convencionais e têm tido impacto na indústria do açúcar devido às suas excelentes características funcionais em alimentos, além de seus aspectos fisiológicos e físicos (PASSOS e. PARK, 2003).

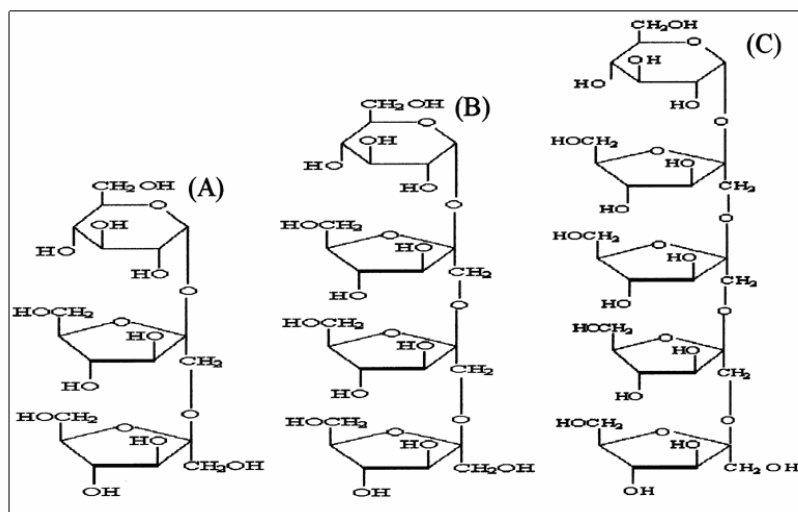


Figura 1 - Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos (A) 1- Kestose, (B) Nistose e (C) Frutofuranosil.
Fonte: PASSOS e PARK (2003).

Os frutooligossacarídeos podem ser divididos em dois grupos do ponto de vista comercial: o 1º grupo é o preparado por hidrólise enzimática de inulina, e consiste de unidades lineares de frutossil com ou sem uma unidade final de glicose. O grau de polimerização desses FOS varia entre 2 e 10 unidades de frutossil. Este processo ocorre amplamente na natureza, e esses oligossacarídeos podem ser encontrados em uma grande variedade de plantas (mais de 36 mil) (ROBERFROID, 1993), mas principalmente em alcachofras, aspargos, beterraba, chicória, banana,

alho, cebola, trigo, tomate, segundo discussão de YAMASHITA *et al.* (1984). O 2º grupo é preparado por reação enzimática de transfrutossilação em resíduos de sacarose, e consiste tanto de cadeias lineares como de cadeias ramificadas de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutossil (HIDAKA *et al.*, 1986).

Os frutooligossacarídeos possuem características que permitem sua aplicação em várias áreas. Como apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, não podem ser considerados carboidratos ou açúcares nem fonte de energia, mas podem ser usados de modo seguro por diabéticos. Têm solubilidade maior que a da sacarose, não cristalizam, não precipitam, e nem deixam sensação de secura ou areia na boca. Os frutooligossacarídeos não são degradados durante a maioria dos processos de aquecimento, mas podem ser hidrolisados em frutose em condições muito ácidas e em condições de exposição prolongada de determinados binômios tempo / temperatura (BORNET, 1994).

2.5 Propriedades dos oligossacarídeos prebióticos

Algumas propriedades dos oligossacarídeos são: baixo poder adoçante (0,3 a 0,6 vezes em relação à sacarose); oligossacarídeos de alta massa molecular fornecem aumento na viscosidade, levando a melhorias no paladar e textura dos alimentos; alteram a temperatura de congelamento, e controlam o nível de escurecimento ocasionado pela reação de Maillard em alimentos que são processados a altas temperaturas; promovem a retenção da umidade, controlando a secagem excessiva e a baixa atividade de água o que favorece o controle microbiológico.

Os oligossacarídeos de grau alimentar disponíveis não são utilizados pela microflora bucal para produção de ácidos e poliglucanos, e são utilizados como substitutos do açúcar devido a sua baixa cariogenicidade. Muitos dos oligossacarídeos não são degradados pelas enzimas digestivas humanas, o que os

tornam desejáveis como adoçantes, alimentos de baixa caloria podendo ser consumidos por diabéticos (MAKINO, 2004).

2.6 Efeitos benéficos atribuídos aos oligossacarídeos prebióticos

Alguns efeitos atribuídos aos prebióticos são a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio e, possivelmente, o metabolismo lipídico, a modulação da composição da microbiota intestinal, a qual exerce um papel primordial na fisiologia gastrintestinal, e a redução do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2002).

A fermentação dos prebióticos no intestino leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta – AGCC (acetato, propionato e butirato) que são totalmente absorvidos pelo trato intestinal. Os AGCC têm um efeito sistêmico no metabolismo da glicose e dos lipídeos causando diminuição da glicemia posprandial e reduzindo a concentração de triglicerídeos e colesterol sanguíneos (PIMENTEL, FRANCKI e GOELIICKE, 2005), e conseqüentemente uma redução do risco de arteriosclerose (KAUR e GUPTA, 2002).

O equilíbrio produzido na microbiota gastrointestinal pelo consumo de frutooligossacarídeos estimula outros benefícios no metabolismo humano, como a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, normalizando a pressão sanguínea e lipídeos séricos e melhoria do metabolismo de diabéticos. Ainda pode-se observar um aumento da digestão e metabolismo da lactose, aumento de reciclagem de compostos como o estrógeno, aumento da síntese de vitaminas (principalmente do grupo B), aumento da produção de compostos imuno estimulantes, que possuem atividade antitumoral, diminuição da produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxílio da restauração da flora intestinal normal durante terapia com antibióticos (YAMASHITA *et al.*, 1984, SPIEGEL *et al.*, 1994).

2.7 Aplicações dos oligossacarídeos prebióticos

Devido as suas características físico-químicas e bioquímicas, os oligossacarídeos têm encontrado aplicação na indústria de alimentos, em produtos utilizados para alimentação humana (bebidas, adoçantes, leite em pó infantil) e animal (ração), assim como aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos (PLAYNE e CRITTENDEN, 1996). Sua utilização como alimentos funcionais é proposta desde 1980, sendo que sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias, em função disso são denominados prebióticos.

As frutanas são não cariogênicas, uma vez que não são utilizadas como substrato de *Streptococcus mutans*, microrganismo responsável pelo aparecimento de cárie. Em virtude de possuírem cadeias de diferentes tamanhos, a inulina e a oligofrutose conferem propriedades distintas aos produtos alimentícios aos quais são adicionadas. A oligofrutose, composta de oligômeros de cadeias curtas, possui propriedades similares às do açúcar e de xaropes de glicose, apresentando 30 a 50% do poder adoçante e maior solubilidade que o açúcar. Sendo assim, essa frutana é freqüentemente empregada em conjunto com edulcorantes de alto poder adoçante, para substituir o açúcar, resultando em um perfil adoçante bem balanceado. A oligofrutose também é utilizada para conferir consistência a produtos lácteos, maciez a produtos de panificação, diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, conferir crocância a biscoitos com baixo teor de gordura e, além disso, substituir o açúcar, também atua como ligante em barras de cereais (SAAD,2006).

Constituída de cadeias longas, a inulina é menos solúvel que a oligofrutose e, quando dispersa na água ou no leite, forma micro cristais que interagem para dar origem a uma textura cremosa. Conseqüentemente, é empregada como substituto de gordura em produtos lácteos, patês, molhos, recheios, coberturas, sobremesas congeladas e produtos de panificação (SAAD, 2006).

2.8 *Leuconostoc mesenteroides* B742

O *Leuconostoc mesenteroides* B742 foi isolado de tomates em conserva deteriorados (ROBYT, 1986), é uma bactéria láctica aeróbia facultativa que utiliza a sacarose como fonte de carbono para produzir a enzima dextrana-sacarase que é responsável pela conversão de sacarose em dextrana. O processo fermentativo é constituído de três etapas básicas: crescimento celular, produção enzimática e produção de oligossacarídeos. O tempo total do processo é variável e o pH final atinge valores entre 4,5 e 4,8 devido à formação de metabólitos ácidos pelo microrganismo (RABELO *et al.*, 2006; VERGARA, 2007).

O *Leuconostoc mesenteroides* B742 é um microrganismo não patogênico e seguro do ponto de vista alimentar que apresenta boa produtividade para produção de oligossacarídeos em meio sintético utilizando-se maltose como acceptor (Chung e Day, 2002). Entretanto esta linhagem é muito pouco estudada quando comparada com a linhagem industrialmente utilizada para obtenção de dextrana e dextrana-sacarase (*L.mesenteroides* B512F). A principal diferença entre a linhagem *L.mesenteroides* B742 e a utilizada industrialmente para obtenção de dextrana e dextrana-sacarase (*L.mesenteroides* B512 F) é a linearidade da cadeia. A enzima da linhagem B512F sintetiza oligossacarídeos através da adição de unidades de glicose ao acceptor pela formação de ligações glicosídicas lineares do tipo α -1,6, já no caso da linhagem B742 são formadas ligações lineares e ramificadas do tipo α -1,6, α -1,2, α -1,3 e α -1,4. (CHUNG E DAY, 2002; RABELO *et al.*, 2007).

2.9 Dextrana-sacarase

A dextrana-sacarase (EC 2.4.1.5) é uma glicosiltransferase bacteriana extracelular que promove a síntese de dextrana. A frutose é um produto natural liberado quando a enzima polimeriza a glicose obtida da sacarose em dextrana. A mesma enzima é também responsável pela síntese de oligossacarídeos prebióticos a partir da reação com o acceptor (MONSAN e PAUL, 1995; MONCHOIS, WILLEMONT e MONSAN, 1999).

A síntese da enzima é tradicionalmente realizada via processo fermentativo com meio sintético contendo sacarose, fonte de nitrogênio e sais minerais. A sacarose é essencial para produção da enzima, uma vez que sua expressão é indutiva, sendo o único indutor conhecido a sacarose (ALSOP, 1983), entretanto o microrganismo se desenvolve em meios contendo outras fontes de carbono sem a produção da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2003).

A produção de dextrana-sacarase é afetada por vários fatores, como temperatura, pH, aeração e concentração do substrato (CORTEZI, MONTI e CONTIERO, 2005). Segundo ALSOP (1983), a enzima bruta e a enzima purificada com adição de dextrana são mais estáveis que a enzima purificada.

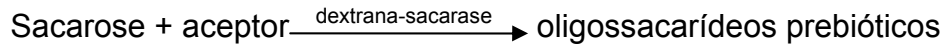
Com objetivo de melhorar a estabilidade enzimática que sofre a influência de vários fatores, foram realizadas diversas pesquisas, sendo verificado que a presença de dextrana, cálcio (Ca^{+2}), polietileno-glicol, metilcelulose e detergentes neutros, aumentam significativamente a estabilidade da dextrana-sacarase (AQUINO, 2006).

2.10 Mecanismo de síntese de oligossacarídeos prebióticos

A enzima dextrana-sacarase é uma transglicosidase que pode ser facilmente obtida a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Esta enzima é extracelular e sua purificação para o processo em questão (síntese enzimática de oligossacarídeos) não requer a purificação total, o que reduz o custo do processo tornando-o economicamente interessante.

A enzima dextrana-sacarase catalisa a formação de dextrana quando em meio contendo sacarose como único substrato. Entretanto, quando em meio contendo um acceptor (maltose, frutose, glicose, etc) como substrato predominante e sacarose como segundo substrato, a enzima produz oligossacarídeos prebióticos (RODRIGUES *et al.*, 2005; RABELO *et al.*, 2006). Esta reação secundária é denominada reação do acceptor. O ajuste da proporção acceptor/sacarose permite a

supressão da síntese de dextrana e a maximização da produção de oligossacarídeos (RODRIGUES, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2005). Um esquema da reação do acceptor é mostrado abaixo:



Quando maltose é utilizada como acceptor, o principal produto desta reação são os isomalto-oligossacarídeos, que podem ser aplicados na indústria de alimentos como adoçantes não cariogênicos, uma vez que estes carboidratos não são fermentáveis pela flora oral humana (MIYAKE *et al.*, 1985), e agentes estabilizantes de bebidas (HIGASHIMURA *et al.*, 2000). Além disso, há estudos indicando que estes carboidratos estimulam o desenvolvimento de bifidobactérias (MACHIDA *et al.*, 1986), que são benéficas ao trato digestivo sem estimular o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (RODRIGUES, 2003). À medida que unidades de glicose se incorporam à cadeia, são formadas as séries homólogas. Para esta reação são conhecidas séries homólogas contendo até 10 unidades de glicose, sendo duas glicoses pertencentes à maltose (ligação glicosídica α -1,4) e as demais incorporadas a este carboidrato por meio da síntese enzimática. O rendimento e o grau de polimerização destes oligossacarídeos dependem da disponibilidade dos aceptores e da sacarose no reator (RABELO, 2006).

2.11 Caju

A cajucultura é uma atividade econômica e social de grande expressão para o Nordeste brasileiro, 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)

O cajueiro é uma planta rústica, originária do Brasil, sendo típica de regiões de clima tropical. Na Amazônia tropical, as árvores apresentam porte bastante elevado; nos Estados do Nordeste brasileiro, a principal espécie de ocorrência é o

Anacardium occidentale L., cujas árvores apresentam pequeno e médio porte, sendo a única espécie do gênero que é cultivada com finalidade comercial, enquanto que as demais espécies são exploradas apenas por extrativismo (SANCHO, 2006).

O cajueiro é considerado uma das culturas de maior importância econômica do Nordeste, sendo cultivada principalmente nos Estados do Ceará (68%), Rio Grande do Norte (11%) e Piauí (8%) (MAIA *et al.* 2001). Em nível mundial é cultivado em vários países, destacando-se pela produção Índia, Brasil, Moçambique e Tanzânia (PERTINARI e TARSITANO, 2002).

Dentre as frutas cultivadas no Nordeste, o caju merece destaque tendo em vista sua importância sócio-econômica para o país, em função da exploração de quase 1 milhão de hectares de cajueiros, que mobilizam no campo cerca de 280 mil pessoas e proporcionam uma produção de 217.062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pedúnculo por ano (OLIVEIRA e ANDRADE, 2004).

O fruto, 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 LCC (líquido da casca da castanha). Desenvolve-se por seis a oito semanas após a polinização, com o pedúnculo (maçã ou pseudofruto) desenvolvendo-se mais intensamente durante as duas últimas semanas. O fruto e o pedúnculo caem juntos e espontaneamente após sete a oito semanas (MENEZES e ALVES, 1995).

É a castanha de caju que apresenta grande valor comercial tanto no Brasil como no exterior, desta forma, o pseudofruto ou pedúnculo acaba por ser subutilizado. Este, que apresenta cerca de 10 vezes o peso da castanha, representa uma quantidade enorme de matéria-prima perdida anualmente, valores que chegam a quase um milhão de toneladas anuais no Estado do Ceará, que detém 54,4 % de quase um milhão de hectares plantados no país com esse tipo de lavoura (SANCHO, 2006).

Deste modo, estima-se que o aproveitamento do pedúnculo para industrialização seja inferior a 12% da produção (LIMA, 2008). Dentre os fatores de influência estão a alta perecibilidade do pedúnculo do caju, associada ao curto período da safra e a inexistência de métodos econômicos de preservação da matéria-prima (COSTA, 1999).

Segundo COSTA *et al.* (2003), o Brasil é pioneiro e líder no aproveitamento de pedúnculo do caju, sendo o Estado do Ceará responsável por metade de toda a área de cajueiro nativos do Brasil – cerca de 364 mil hectares.

2.12 Composição química do pedúnculo do caju

A composição do caju é bastante complexa e, se por um lado, a presença de vitaminas, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos tornam o caju um alimento importante nestes aspectos, por outro lado é responsável pela sua alta perecibilidade, exigindo cuidados especiais para a estocagem, transporte, limpeza e processamento. Ocorre uma série de transformações físicas e químicas durante o desenvolvimento e maturação do pedúnculo de cajueiro (GALVÃO, 2006).

A composição físico-química do pedúnculo varia largamente em função, dentre outras, da variedade, estágio de maturação, tamanho, duração da colheita e variações ambientais regionais (SOUZA *et al.*, 2002). A Tabela 2 apresenta, respectivamente, as características químicas e físico-químicas do pedúnculo de caju.

Tabela 2 - Composição química e físico-química 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)

O valor nutritivo do pedúnculo de caju revela-se sob a forma de vitaminas e sais minerais (SOUZA *et al.*, 2002), possuindo cerca de 156 mg a 387 mg de vitamina C, além de minerais como cálcio, ferro e fósforo. Além de vitaminas, vale ressaltar que, o caju também apresenta em sua composição carotenóides e antocianinas, pigmentos naturais responsáveis por sua coloração característica, que também exercem funções benéficas ao organismo (SANCHO, 2006). SILVA e NAVES (2001) salientam que o caju é considerado uma ótima fonte de vitamina C e boa fonte de vitaminas do complexo B, como riboflavina e tiamina.

No pedúnculo do caju, os principais açúcares encontrados são: maltose, sacarose, glicose, celobiose e rafinose. Na maioria dos trabalhos publicados verifica-se uma percentagem muito baixa de açúcares não redutores. A glicose constitui o principal açúcar presente no pedúnculo do caju, seguido por frutose (PRICE *et al.*, 1975).

2.13 Suco de caju

Os sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas, também, por serem fontes naturais de carboidratos, carotenóides, vitaminas, minerais e outros componentes importantes. Uma mudança apropriada na dieta em relação à inclusão de componentes encontrados em frutas e suco de frutas pode ser importante na prevenção de doenças e para uma vida mais

saudável. O Brasil consumiu em 2003 aproximadamente 2,2 bilhões de litros de sucos, nas mais diferentes formas. Destes, 579 mil litros são de sucos integrais, com destaque para caju (51%) e maracujá (24%) (PINHEIRO *et al.*, 2006).

Segundo a legislação brasileira que estabelece o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco tropical de caju, o suco de caju clarificado é definido como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale*, L.), através de processo tecnológico adequado. O Suco de caju clarificado deve obedecer às características abaixo (BRASIL, 2000):

- Cor: variando de branco a amarelado;
- Sabor: próprio, levemente ácido e adstringente;
- Aroma: próprio.

A legislação brasileira define os seguintes limites: sólidos solúveis (°Brix a 20°C), mínimo 10; acidez total em ácido cítrico, mínimo 0,3 g/100 g; ácido ascórbico, mínimo 80 mg/100 g; e açúcares totais, naturais do caju, máximo 15 g/100 g (BRASIL, 2000).

O suco de caju é uma complexa mistura de vitaminas, polifenóis, açúcar, sais minerais, ácidos orgânicos, aminoácidos, é uma excelente fonte de vitamina C e contém aproximadamente seis vezes mais vitamina C do que o suco de laranja (VERGARA, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do microrganismo

Foi utilizada uma cultura estoque do microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* B742 mantida congelada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos (LABIOTEC/DETAL/UFC). Esta linhagem foi obtida liofilizada junto ao banco de microrganismos do Departamento Estadual de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agricultural, Peoria, Illinois, NRRL Culture Collection*).

3.2 Ativação do *Leuconostoc mesenteroides* B742 liofilizado

O crescimento da cepa liofilizada foi realizado com o meio padrão otimizado por GUIMARÃES *et al.* (1999), o qual é descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Meio padrão otimizado

Reagente	Concentração (g/L)
Sacarose	50,0
Extrato de levedura	20,0
Fosfato de potássio dibásico	20,0
Sulfato de magnésio	0,20
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,01
Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01
pH 6,5 121°C/15min	

Fonte: GUIMARÃES *et al.* (1999).

As soluções salinas foram preparadas separadamente em concentrações superiores (soluções estoque), sendo posteriormente diluídas para preparação do meio padrão de forma a atingirem as concentrações da Tabela 3. Preparou-se separadamente na forma concentrada o fosfato de potássio dibásico e esterilizou-se em Erlenmeyer de 250 mL para ser adicionado à frio 10 mL ao mosto na hora da inoculação. Ensaios anteriores constataram que, quando este sal é autoclavado na presença dos demais componentes do meio de fermentação, ocorre a precipitação

no meio (QUEIROZ, 1987). O pH foi ajustado com ácido fosfórico concentrado e o meio foi dividido em Erlenmeyers contendo alíquotas de 100 mL, cada um, os quais foram esterilizados.

O microrganismo liofilizado foi então inoculado no meio, contendo fosfato, e cultivado em *shaker* rotatório TECNAL, modelo TE-420 a 30°C com agitação de 150 rpm. Este procedimento foi repicado por três vezes até a formação de uma boa quantidade de biomassa (RODRIGUES, LONA e FRANCO, 2003). Após o crescimento, o microrganismo foi congelado em tubos contendo 8,0 mL cada em freezer (- 20°C) em solução de glicerol 50 % (v/v) para ser usado como inóculo da fermentação.

3.3 Ativação do microrganismo congelado

O *Leuconostoc mesenteroides* B742, foi ativado inoculando-se um tubo de cultura estoque (congelada a -20°C) em 100 mL do meio sintético padrão otimizado por GUIMARÃES *et al.* (1999) contendo somente sacarose como fonte de carbono (indutor da produção da enzima). A ativação foi conduzida em *shaker* rotatório TECNAL, modelo TE-420 a 30°C com agitação de 150 rpm por 12 horas.

3.4 Obtenção do suco de caju

O suco de caju foi 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 dos sólidos totais e taninos (ABREU, 2006). Neste processo, sobre 50 mL de suco de caju, resultantes da centrifugação da polpa, foram adicionados 5,0 mL de solução de gelatina 1% (p/v). Após 40 minutos, as suspensões foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 42 (COURI *et al.*, 2002).

Nos ensaios fermentativos, foi utilizado o suco de caju clarificado *in natura* e para a síntese dos oligossacarídeos prebióticos, o referido suco foi submetido à concentração à vácuo em temperatura igual a 60°C até atingir a concentração de 85°Brix.

O suco de caju clarificado *in natura* é altamente perecível e foi estocado congelado (-20°C) para evitar deterioração, uma vez que não foram utilizados aditivos por se tratar de uma matéria prima para uso em processos fermentativos. No entanto, o suco de caju concentrado foi estocado à temperatura ambiente.

3.5 Caracterização físico-química do suco de caju clarificado

O suco de caju foi físico-quimicamente caracterizado quanto ao pH (potenciometria direta), açúcares redutores pelo método DNS (MILLER, 1959), proteínas, segundo BRADFORD (1976) e composição mineral (sódio, potássio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, zinco e manganês) obedeceu aos escritos de MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA (1997). A metodologia das análises é descrita no item 3.11.

3.6 Otimização do meio de cultura para a produção da enzima dextran-sacarase

Para o estudo da produção de oligossacarídeos prebióticos a partir do *Leuconostoc mesenteroides* B742 utilizando como substrato suco de caju, inicialmente foi realizada a otimização do meio de cultura através de um estudo do crescimento do *Leuconostoc mesenteroides* B742 em meio sintético com a substituição da fonte de nitrogênio (extrato de levedura), no qual foram preparados cinco meios de cultura apresentando em sua composição 50g/L de sacarose e as mesmas concentrações de sais e fosfato de potássio estabelecidas no meio padrão utilizado para a ativação do microrganismo, conforme apresentado na Tabela 3. As fontes de nitrogênio utilizadas nos meios de cultura na concentração

de 10 g/L são apresentadas na Tabela 4. Nos meios 3 e 5 foi adicionada uma solução contendo 5 mg/L de cada uma das seguintes vitaminas: B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₃ (nicotinamida), B₅ (ácido pantotênico), B₉ (ácido fólico), e B₁₂ (cianocobalamina), uma vez que o extrato de levedura contém vitaminas.

Tabela 4 – Fontes de nitrogênio utilizadas

Meio	Fonte de nitrogênio (10 g/L)
1 (Controle)	Extrato de levedura
2	Sulfato de Amônio
3	Sulfato de Amônio com vitaminas
4	Uréia
5	Uréia com vitaminas

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6.5 (pH ótimo de crescimento do *L. mesenteroides* B742) e os mesmos foram esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos. Fosfato de potássio foi adicionado à frio conforme descrito no item 3.2. O microrganismo ativado foi inoculado a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura. Os ensaios foram realizados em *shaker* rotatório TECNAL, modelo TE-420 a 30°C e 150 rpm, em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura. A fermentação foi conduzida por 6 horas, de acordo com os escritos de RODRIGUES (2003).

A partir dos resultados obtidos neste estudo, a substituição da fonte de nitrogênio foi avaliada através de um planejamento experimental 2² central composto com dois pontos centrais (RODRIGUES e IEMMA, 2005), onde foram realizados 10 ensaios tendo como variáveis as concentrações de extrato de levedura e sulfato de amônio conforme apresentado na Tabela 5. As variáveis resposta obtidas foram o pH, biomassa e dextrana. Foi também realizada uma fermentação controle com um meio de cultura com a mesma composição do meio padrão citado no item 3.2.

Tabela 5 - Planejamento experimental para otimização do meio de cultura

Ensaio	Extrato de levedura (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)
1	4,0	4,0
2	4,0	16,0
3	16,0	4,0
4	16,0	16,0
5	1,5	10,0
6	18,0	10,0
7	10,0	1,5
8	10,0	18,0
9	10,0	10,0
10	10,0	10,0

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6.5 (pH ótimo de crescimento do *L. mesenteroides* B742) e os mesmos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. O microrganismo ativado foi inoculado a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura. Durante a fermentação foram monitorados o pH e o crescimento microbiano, em intervalos de tempo regulares. O processo foi interrompido após 7,5 horas devido a ausência de crescimento microbiano. No final da fermentação as células foram removidas por centrifugação em centrífuga de marca Sigma[®], modelo 6-15 a 7500 x g por 10 minutos, e a dextrana foi precipitada com 3 volumes de etanol 96 % para ser analisada posteriormente.

A velocidade específica de crescimento microbiano foi determinada de acordo com a equação abaixo:

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

Onde:

μ_x taxa específica de crescimento do microrganismo (h^{-1})

X concentração de biomassa em base seca (g/L).

3.7 Otimização das condições da determinação da atividade da enzima dextrana-sacarase

O estudo das condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da enzima dextrana-sacarase produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* B742 foi realizado através de um planejamento experimental 2^2 central composto com três pontos centrais (RODRIGUES e IEMMA, 2005), onde foram realizados 11 ensaios tendo como variáveis a temperatura e o pH conforme apresentado na Tabela 6. A variável resposta obtida foi a atividade enzimática.

Tabela 6 - Planejamento experimental para otimização da atividade da enzima dextrana-sacarase

Ensaio	pH da solução de atividade	Temperatura (°C)
1	5,5	25
2	5,5	35
3	6,5	25
4	6,5	35
5	5,5	30
6	6,5	30
7	6,0	25
8	6,0	35
9	6,0	30
10	6,0	30
11	6,0	30

Foi realizada uma fermentação em meio sintético em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura com pH ajustado para 6,5 com ácido fosfórico esterilizado em autoclave a 121° C por 15 minutos. O microrganismo ativado foi inoculado a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura e a fermentação foi conduzida até que o pH do mesmo atingisse o valor 5,5 (pois abaixo deste valor ocorre a desnaturação da enzima) e em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 7500 x g por 10 minutos em centrífuga Sigma, modelo 6-15. Foi determinada a atividade enzimática nas condições do planejamento experimental em intervalos de tempo de 0, 30 e 60 minutos.

A partir dos resultados obtidos no planejamento, foi realizado um estudo da atividade enzimática em pH 6,5 nas temperaturas de 30°C e 35°C em intervalos de tempo de 0, 10, 20 e 30 minutos.

3.8 Estabilidade da enzima dextrana-sacarase quanto ao pH e temperatura

A estabilidade da enzima dextrana-sacarase produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* B742 em meio sintético foi avaliada através de um planejamento experimental fatorial 2² com um ponto central onde foram realizados 5 ensaios tendo como variáveis a temperatura e o pH conforme apresentado na Tabela 7. A variável resposta obtida foi a atividade enzimática.

Tabela 7 - Planejamento experimental para investigar a estabilidade da enzima dextrana-sacarase em meio sintético

Ensaio	pH	Temperatura (°C)
1	4,5	25
2	4,5	35
3	6,5	25
4	6,5	35
5	5,5	30

A fermentação foi realizada até que o pH do mesmo atingisse o valor 5,5, e em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 7500 x g por 10 minutos em centrífuga Sigma, modelo 6-15. O pH e a temperatura foram ajustados para as condições do planejamento experimental e determinou-se a atividade enzimática em intervalos de 0 e 10 minutos durante 3 horas (RODRIGUES *et al.*, 2003). Em seguida foi realizado o mesmo estudo no suco de caju em pH 6,5 nas temperaturas de 25°C e 30°C por um período de 48 horas.

3.9 Fermentação do suco de caju para produção da enzima dextrana-sacarase

A partir dos dados obtidos com a otimização do meio de cultura, foi realizada a fermentação do suco de caju com o *Leuconostoc mesenteroides* B742 para a produção da enzima dextrana-sacarase.

O substrato utilizado para a fermentação em substituição ao meio de cultura sintético foi preparado por diluição do suco de caju clarificado para atingir a quantidade de açúcar redutor desejada (50g/L) e complementado com adição de sacarose (50g/L), extrato de levedura (4g/L) e sulfato de amônio (4g/L), de acordo com os resultados encontrados no ensaio de otimização do meio de cultura.

Posteriormente, o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5, que representa o ótimo crescimento do *L. mesenteroides* B742, foi também adicionado fosfato de potássio ao substrato, conforme valor de referência apresentado na Tabela 3. A esterilização do meio foi realizada em autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos. Foi adicionada uma alíquota de 10 mL de fosfato de potássio em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura e em seguida, o microrganismo ativado no meio sintético foi inoculado a um volume correspondente a 10% do volume do meio de cultura. A fermentação foi conduzida em *shaker* rotatório TECNAL, modelo TE-420 a 30°C com agitação de 150 rpm e foi interrompida quando o pH atingiu o valor de 5,5 e em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 7500 x g por 10 minutos em centrífuga Sigma, modelo 6-15. Dessa forma, foi obtida a enzima bruta.

3.10 Síntese enzimática dos oligossacarídeos prebióticos

Conhecendo as condições de atividade enzimática ótima e estabilidade da enzima no suco de caju, as sínteses foram realizadas com a enzima bruta produzida no suco de caju. As concentrações de substratos (glicose, frutose e sacarose) para a síntese dos oligossacarídeos foram avaliadas através de um planejamento fatorial,

2² central compósito com três pontos centrais (RODRIGUES e IEMMA, 2005), onde foram realizados 11 ensaios (Tabela 8) tendo como variáveis as concentrações de sacarose e açúcares redutores (glicose e frutose), segundo RABELO *et al.* (2005). As concentrações de açúcares redutores utilizados no planejamento experimental foram obtidas a partir do suco de caju concentrado que apresentava um teor de 820 g/L de açúcares redutores. Foram obtidos como resposta os açúcares redutores e totais consumidos, a dextrana, os oligossacarídeos prebióticos, os rendimentos em dextrana e oligossacarídeos.

Tabela 8 - Planejamento experimental para a síntese enzimática dos oligossacarídeos prebióticos

Ensaio	Sacarose (g/L)	Açúcares redutores (g/L)
1	25,00	62,50
2	25,00	125,00
3	75,00	62,50
4	75,00	125,00
5	25,00	93,75
6	75,00	93,75
7	50,00	62,50
8	50,00	125,00
9	50,00	93,75
10	50,00	93,75
11	50,00	93,75

Para a realização da síntese enzimática, foram utilizados Erlenmeyers de 50 mL contendo 8 mL do caldo centrifugado e enzima bruta que apresentava uma atividade de 103,76 UDS/mL e 23,26 g/L de açúcares redutores residuais (determinados no ensaio fermentativo para a produção da enzima). O pH foi ajustado para 6,5, além das concentrações de sacarose e açúcares redutores correspondentes a cada ensaio. Foram adicionadas três gotas de azida 1% a cada Erlenmeyer para evitar a contaminação microbiológica. A síntese enzimática foi mantida durante 72 horas, pois durante esse período ocorre o consumo total da sacarose (VERGARA, 2007). Após o término da síntese a dextrana foi removida através da precipitação com três volumes de etanol 96%.

Os resultados de açúcares redutores e de dextrana, no final do ensaio, foram calculados experimentalmente. Os açúcares totais, açúcares totais consumidos, açúcares redutores totais, açúcares redutores totais consumidos, oligossacarídeos prebióticos e os rendimentos em dextrana e em oligossacarídeos foram calculados através de balanço de massa conforme as equações 2 a 8:

$$AR_T \text{ (g/L)} = AR_{SUCO} + AR_{CF} \quad (2)$$

$$AT \text{ (g/L)} = AR_T + Sac \quad (3)$$

$$AR_{CONS} \text{ (g/L)} = AR_T - AR_F \quad (4)$$

$$AT_{CONS} \text{ (g/L)} = Sac + AR_{CONS} \quad (5)$$

$$OLIGO \text{ (g/L)} = AT_{CONS} - DXT \quad (6)$$

$$Y_{OLIGO} \text{ (%) } = \frac{\text{Oligo (g/L)}}{\text{Açúcar total consumido (g/L)}} \quad (7)$$

$$Y_{DXT} \text{ (%) } = \frac{\text{Dextrana (g/L)}}{\text{Açúcar total consumido (g/L)}} \quad (8)$$

Onde,

AR_T	açúcares redutores totais no início do ensaio
AR_{SUCO}	açúcares redutores do suco de caju concentrado
AR_{CF}	açúcares redutores residuais do caldo fermentado
AT	açúcares totais
AR_T	açúcares redutores totais
AR_F	açúcares redutores no final do ensaio
AT_{CONS}	açúcares totais consumidos no ensaio
Sac	sacarose
AR_{CONS}	açúcares redutores consumidos no ensaio
$OLIGO$	oligossacarídeos
DXT	dextrana
Y_{OLIGO}	rendimento em oligossacarídeos
Y_{DXT}	rendimento em dextrana

3.11 Métodos Analíticos

3.11.1 pH

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

3.11.2 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados de acordo com o método de MILLER (1959), o qual consiste na reação da amostra com o reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) a 100°C durante 5 minutos, sendo este um método colorimétrico onde a concentração dos açúcares redutores após a reação com DNS é proporcional a absorvância no espectro visível a 540 nm.

Para a determinação das concentrações de açúcares na amostra foi feita uma curva padrão de calibração através de soluções padrão em concentrações conhecidas (faixa de 0,2 a 2,0 g/L). Esta curva de calibração é uma reta passando pela origem dos eixos, cuja equação é determinada através de regressão linear.

A determinação da curva de calibração foi feita adicionando-se 125 µL de cada solução padrão em um tubo de ensaio contendo 125 µL da solução de DNS. A mistura foi aquecida à 100°C por 5 minutos e resfriada posteriormente em banho de gelo. Após atingir a temperatura ambiente, a mistura foi diluída com 2.250 µL de água destilada e a leitura da absorvância no comprimento de onda de 540 nm foi realizada em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP2000UV. Para os ensaios foi realizado o mesmo procedimento utilizado para a construção da curva padrão

3.11.3 Determinação de proteínas

Para determinação da massa proteica total foi utilizado o método de BRADFORD (1976), que consiste na reação da proteína com o corante Coomassie Brilliant Blue G250. Para isso foi preparada uma solução contendo 0,06 % de Coomassie Brilliant Blue G250 em 1,5 % HCl (p/v), a qual foi posteriormente filtrada em papel de filtro Whatman n° 1. A partir dessa solução foi preparada uma curva padrão com albumina bovina (BSA) em concentrações conhecidas (faixa de 10 a 200 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 a 595 e 465 nm contra a água foi realizada em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP2000UV. A razão das absorbâncias (595 nm/465 nm) foi *plotada* em função da massa de BSA e a equação da reta foi obtida por regressão linear dos pontos.

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

3.11.4 Composição mineral do suco de caju

A composição mineral do suco de caju foi avaliada através da determinação de sódio, potássio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, zinco e manganês. As análises para a quantificação de minerais foram realizadas em triplicata, sendo as amostras inicialmente submetidas ao processo de digestão durante 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. Os demais minerais foram quantificados por espectrofotometria de

absorção atômica em um equipamento Perkin-Elmer, modelo A-Analyst 300 (MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA, 1997).

3.11.5 Determinação do crescimento microbiano

A determinação do crescimento microbiano foi realizada através de leitura da absorbância a 590 nm em espectrofotômetro Spectrum®, modelo SP200UV. O procedimento consistiu em diluir uma alíquota da suspensão contendo as células em água destilada e realização da leitura da absorbância contra um branco com água. A massa seca celular foi calculada através de uma curva de calibração construída com a determinação do peso seco das células seguido de diluição (Rodrigues *et al.*, 2003).

3.11.6 Determinação da Dextrana

A dextrana precipitada, conforme descrito no item 3.6, foi re-suspensa em água destilada e determinada segundo o método fenol ácido sulfúrico para determinação de carboidratos totais (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.11.7 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática no caldo fermentado foi determinada através da quantificação da frutose liberada em meio reacional contendo sacarose como substrato (HEINKE *et al.*, 1999).

A atividade enzimática foi determinada em termos de unidade de dextrana-sacarase (UDS/mL). A UDS nada mais é do que a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana a 30°C liberando 0,52 mg de frutose em 1 hora. Entretanto não é necessário que a cinética seja determinada no período de 1 hora, pois trata-se de uma reta.

Realizou-se o cálculo da atividade enzimática utilizando a seguinte equação:

$$(\text{Atividade UDS / mL}) = \frac{1 \beta_1 60 d}{\alpha_1 0,52} \quad (9)$$

Onde:

α_1 coeficiente angular da curva de calibração de DNS (mg/ABS.ml)

β_1 coeficiente angular da reta da curva cinética (ABS/min)

60 conversão do tempo de minutos para hora

d diluição da amostra

O coeficiente angular da curva foi calculado da seguinte forma:

$$\beta = \frac{ABS_{10} - ABS_0}{10} \quad (10)$$

ABS_{10} valor médio das leituras de absorbância no tempo 10 minutos

ABS_0 valor médio das leituras de absorbância no tempo zero

Para a determinação da atividade da enzima obtida no meio sintético, foram preparados 100 ml de uma solução reativa contendo 18,2 ml de uma solução estoque de sacarose (600 g/L) em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de $CaCl_2$ e 4,5 ml de solução tampão de acetato de sódio 20 mM com 1,2 g/L de $CaCl_2$. O pH da solução foi ajustado para 6,5. Uma alíquota de 400 μ L desta solução de atividade foi adicionada a dois tubos de ensaio e em seguida, uma alíquota de 100 μ L do caldo fermentado centrifugado foi adicionada a cada tubo de ensaio, que foram incubados a 30°C em banho termostatizado. Foram adicionados 500 μ L do reagente de DNS a cada um dos tubos nos tempos 0 e 10 minutos respectivamente. Os tubos foram então aquecidos por 5 minutos a 100°C e resfriados à temperatura ambiente em banho de gelo. A cada um dos tubos foram adicionados 4,5 mL de H_2O destilada. Os tubos foram homogeneizados e a leitura foi realizada a 540 nm contra o branco da solução de atividade.

Para a determinação da atividade da enzima obtida no suco de caju, uma alíquota de 400 µL da solução de atividade foi adicionada a dois tubos de ensaio e em seguida, uma alíquota de 100 µL do caldo fermentado centrifugado foi adicionada a cada tubo de ensaio, que foram incubados a 30°C em banho termostatizado. Foi então adicionado 1500 µL de etanol a cada um dos tubos nos tempos 0 e 10 minutos respectivamente. As amostras foram diluídas e foi realizado o procedimento de determinação de açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959).

3.11.8 Detecção de oligossacarídeos através de cromatografia de camada delgada (CCD)

Os oligossacarídeos prebióticos foram detectados através de cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel da marca Whatman, sendo utilizadas placas tipo K6 (sílica gel 60 A). Foi utilizada a técnica de múltiplas ascensões, que permite uma melhor separação dos produtos de interesse, e placas de dimensões de 20 x 20 cm permitindo a corrida de aproximadamente 15 amostras simultâneas. Para a separação dos oligossacarídeos foi utilizado o sistema acetonitrila/acetato de etila/1-propanol/água (85:20:50:90), sendo realizadas duas ascensões (RODRIGUES, 2003).

Após diluição adequada, as amostras foram aplicadas na borda inferior da placa à uma distância de 1,5 cm da borda. Foram aplicados 10 µL de cada uma das amostras e mais os padrões de sacarose, frutose e glicose para identificação das respectivas manchas. Para aplicação das amostras, foram utilizadas micropipetas. As placas foram colocadas na câmara de desenvolvimento saturada com a fase móvel. Ao término de cada ascensão a placa foi seca com secador de cabelos para remoção completa da fase móvel.

Como sistema de detecção, foi utilizada uma solução constituída de 0,3 % (p/v) de 1-naftiletilenodiamina e 5 % (v/v) de H₂SO₄ concentrado em metanol. Ao término da última ascensão, as placas foram removidas da câmara de

desenvolvimento, secas conforme procedimento descrito acima, e mergulhadas rapidamente no reagente de detecção. Após secagem natural em capela (à temperatura ambiente e sem uso do secador de cabelos), as placas foram colocadas em um forno a 120 °C por 10 minutos para revelação das manchas.

3.12 Análise dos dados

Os ensaios fermentativos foram realizados em duplicata e as determinações analíticas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 95% de confiança, utilizando o programa estatístico Statistica (Statsoft) versão 7.0. cujos resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do suco de caju clarificado

Na Tabela 9 são apresentados os resultados referentes a determinação da composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado.

Tabela 9 - Composição de minerais, açúcares redutores e proteínas do suco de caju clarificado

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

DL* - Limite de detecção.

De acordo com a Tabela 9, os resultados mostraram que o suco de caju pode ser empregado como uma alternativa de substrato para o crescimento do *Leuconostoc mesenteroides* B742 e para a produção de oligossacarídeos prebióticos, pois apresentou em sua composição diversos minerais, sendo as concentrações mais elevadas de potássio, fósforo e magnésio. O suco de caju também apresentou uma quantidade expressiva de açúcares redutores, porém uma baixa concentração de proteínas, daí a necessidade da complementação do suco com uma fonte de nitrogênio, além de sacarose que é necessário para a indução da produção da enzima dextrana-sacarase.

Segundo HONORATO *et al.* (2006), o suco de caju clarificado é rico em glicose e frutose e, dessa forma, funciona como fonte de aceptores (frutose e glicose) para a síntese de oligossacarídeos prebióticos.

VERGARA (2007), estudou a produção de oligossacarídeos a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* B512F em suco de caju clarificado e verificou que o processo fermentativo utilizando o suco de caju clarificado como substrato é viável para a produção de oligossacarídeos uma vez que se observou a produção de dextrana, aumento da concentração celular e os nutrientes foram consumidos pelo microrganismo.

A análise de pH do suco de caju apresentou um valor de $4,37 \pm 0,01$, 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 a produção da enzima dextran-sacarase

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos com relação à biomassa formada no estudo preliminar onde foi avaliada a substituição da fonte de nitrogênio do meio de cultura, cujos resultados foram analisados pelo Teste de Tukey com 95% de confiança, no qual foi verificado que não houve diferença significativa entre os resultados, exceto quando comparados com o extrato de levedura.

Tabela 10 - Crescimento microbiano nas diferentes fontes de nitrogênio

Meio	Fonte de nitrogênio (10 g/L)	Biomassa (g/L)
1	Extrato de levedura	$3,414^a \pm 0,005$
2	Sulfato de Amônio	$2,243^b \pm 0,020$
3	Sulfato de Amônio com vitaminas	$2,299^b \pm 0,055$
4	Uréia	$2,118^b \pm 0,110$
5	Uréia com vitaminas	$1,987^b \pm 0,025$

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Figura 2 apresenta a biomassa final obtida com as diferentes fontes de nitrogênio testadas.

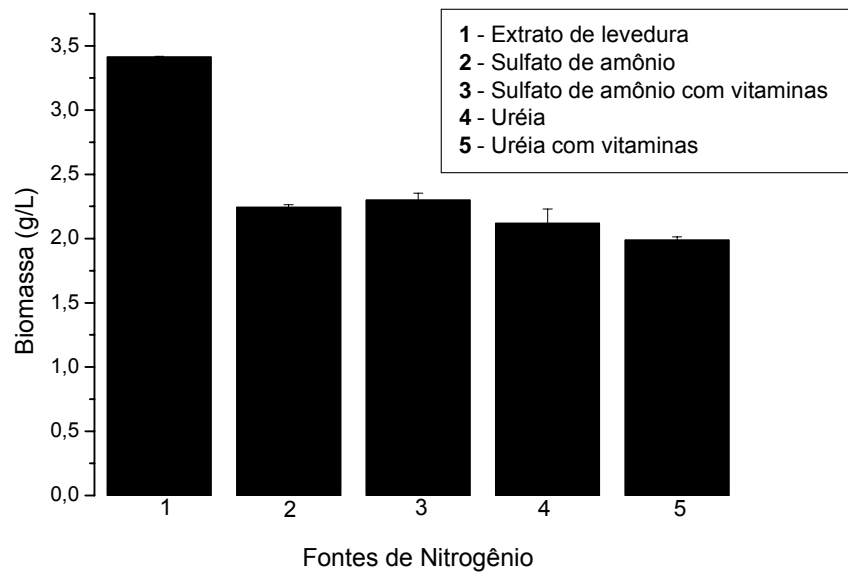


Figura 2 - Concentração de biomassa obtida com as diferentes fontes de nitrogênio testadas conforme a Tabela 10.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 2, observa-se que o maior crescimento microbiano ocorreu no meio contendo extrato de levedura, que é a fonte de nitrogênio padrão utilizada para o cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*. Nos meios contendo sulfato de amônio com e sem vitaminas houve um crescimento ligeiramente superior aos meios onde uréia foi utilizada como fonte de nitrogênio. Como a diferença entre os meios contendo sulfato de amônio com e sem vitaminas não foi expressiva, e sendo este composto técnico-economicamente viável, devido ao seu baixo custo e elevada solubilidade, o sulfato de amônio foi então utilizado como fonte de nitrogênio para os demais ensaios em combinação com o extrato de levedura.

A Tabela 11 apresenta as condições experimentais e os resultados onde foram avaliados o pH, a biomassa e dextrana formada no final da fermentação de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 5. Na determinação da biomassa foi desconsiderada a biomassa inicial. A Tabela 12 apresenta os efeitos das variáveis independentes na concentração de biomassa no final da fermentação.

Tabela 11 - Planejamento experimental e resultados obtidos de pH, biomassa e dextrana

Ensaio	Extrato de levedura (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)	pH	Biomassa (g/L)	Dextrana (g/L)
Controle	20,0	0,0	4,37	4,017±0,111	31,456±4,856
1	4,0	4,0	4,19	3,298±0,055	24,172±2,639
2	4,0	16,0	4,18	3,090±0,118	36,418±3,695
3	16,0	4,0	4,18	3,612±0,048	39,063±1,320
4	16,0	16,0	4,30	3,549±0,005	34,359±1,742
5	1,50	10,0	4,37	2,844±0,048	45,497±2,428
6	18,0	10,0	4,30	3,281±0,008	11,239±1,626
7	10,0	1,5	4,24	3,459±0,005	35,310±5,120
8	10,0	18,0	4,25	3,366±0,053	45,708±6,440
9	10,0	10,0	4,23	3,487±0,008	35,257±2,111
10	10,0	10,0	4,24	3,416±0,043	40,747±1,478

O planejamento experimental foi realizado de forma que o ponto central apresentasse a mesma concentração do meio controle (20g/L) como fonte de nitrogênio.

Tabela 12 - Efeitos estimados para a biomassa

Fator	Biomassa	
	Efeito	S.E.
Média	3,45*	0,08*
Extrato de Levedura (L)	0,35*	0,08*
Extrato de Levedura (Q)	-0,31*	0,11*
Sulfato de Amônio (L)	-0,10	0,08
Sulfato de Amônio (Q)	0,04	0,11
Extrato x Sulfato	0,07	0,12

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O modelo de regressão obtido para a biomassa está expresso pela equação 11. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão é apresentada na Tabela 13, respectivamente.

$$Biomassa (g/L) = 2,96 + 1,06 \times 10^{-1} EL - 4,36 \times 10^{-3} EL^2 - 2,83 \times 10^{-2} SA + 4,94 \times 10^{-4} SA^2 - 1,01 \times 10^{-3} EL \cdot SA \quad (11)$$

Onde:

EL concentração de extrato de levedura (g/L)

SA concentração de sulfato de amônio (g/L)

Tabela 13 - Análise de variância para a biomassa (Eq. 4)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	0,42	5	0,084	6,46
Residual	0,05	4	0,013	
Total	0,47	9		
Coefficiente de determinação	0,89			
F Tabelado (95%)				$F_{5,4} = 6,26$

De acordo com a Tabela ANOVA, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, o valor de F , com 95% de confiança, calculado para o modelo foi 6,46, maior que o valor de $F_{5,4}$ Tabelado (6,26).

Para a produção de dextrana, o modelo de regressão não foi estatisticamente significativo, portanto os resultados são apresentados no ANEXO 1. Entretanto, de acordo com os dados da Tabela 11, verificou-se uma considerável produção de dextrana, indicando que houve produção da enzima dextrana-sacarase, cujos valores na maioria dos ensaios realizados foram superiores ao obtido no ensaio controle. Verifica-se também que em alguns ensaios a quantidade de dextrana formada foi superior a máxima teórica (25 g/L), incluindo o valor obtido para o controle. Este resultado pode ser atribuído ao fato de a linhagem estudada, também denominada de *Leuconostoc citreum* B742, ser capaz de produzir não somente glicosiltransferases mas também frutossiltransferases que polimerizam frutose e não somente glicose (ILLANA *et al.*, 2003). Dessa forma, parte da dextrana, que é analisada como carboidrato total pode ser devido à formação de frutanas.

As Figuras de 3 a 13 apresentam os perfis de concentração celular, pH, velocidades específica e instantânea durante a fermentação nos ensaios realizados.

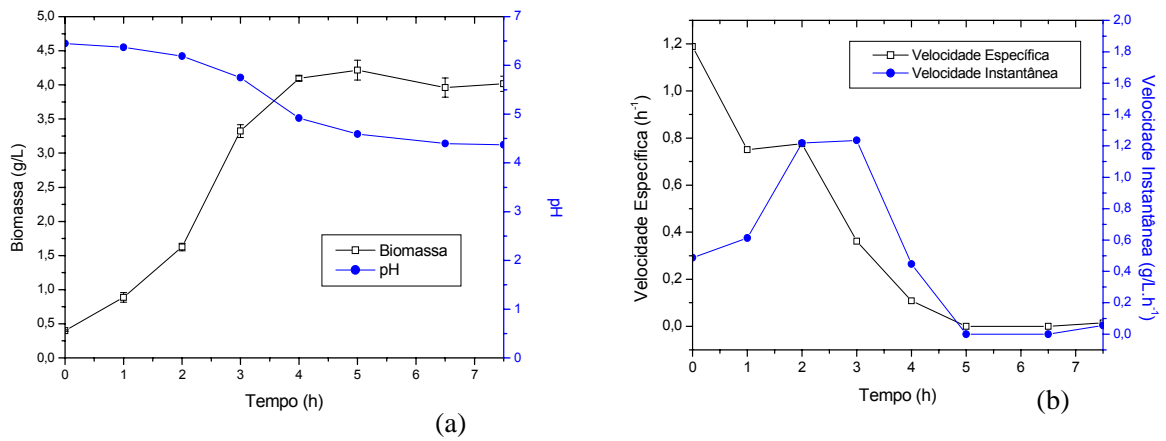


Figura 3 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio controle; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio controle.

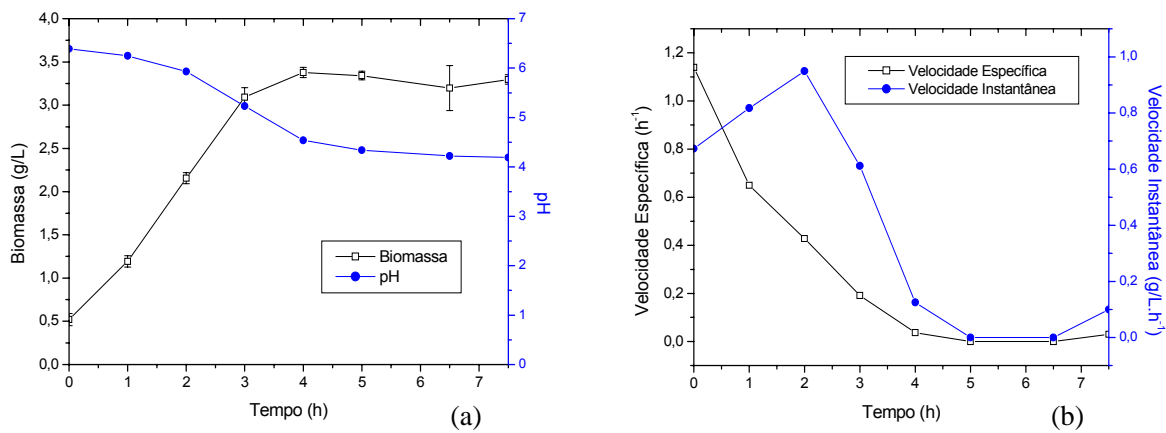


Figura 4 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 1; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 1.

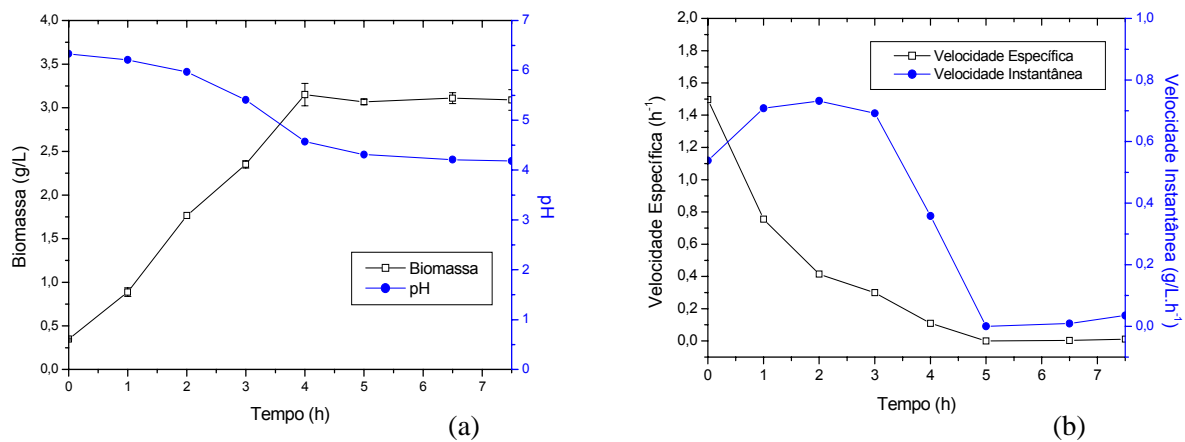


Figura 5 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 2; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 2.

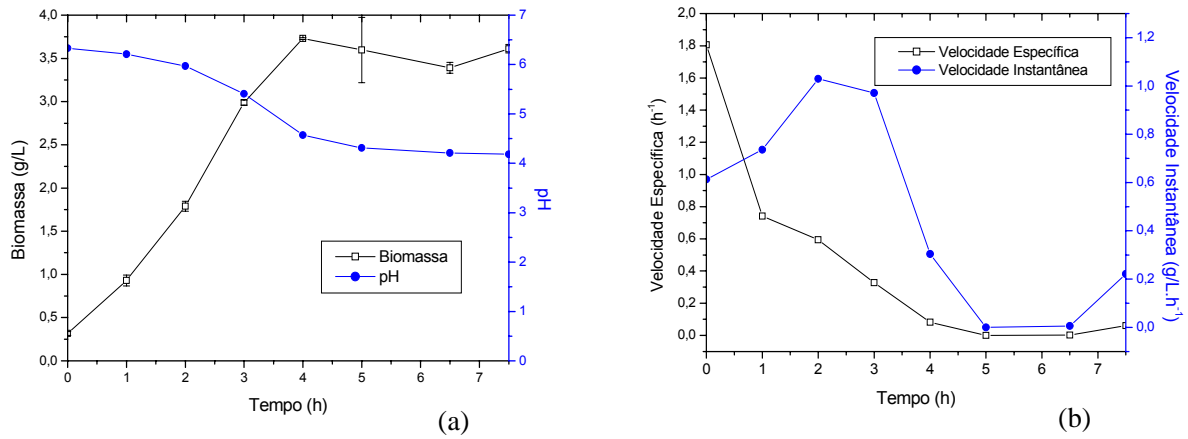


Figura 6 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 3; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 3.

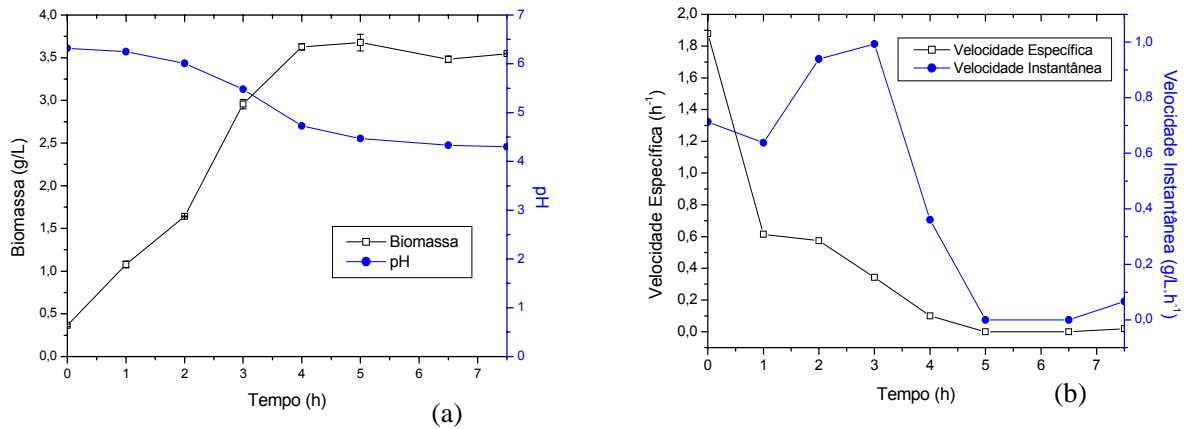


Figura 7 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 4; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 4.

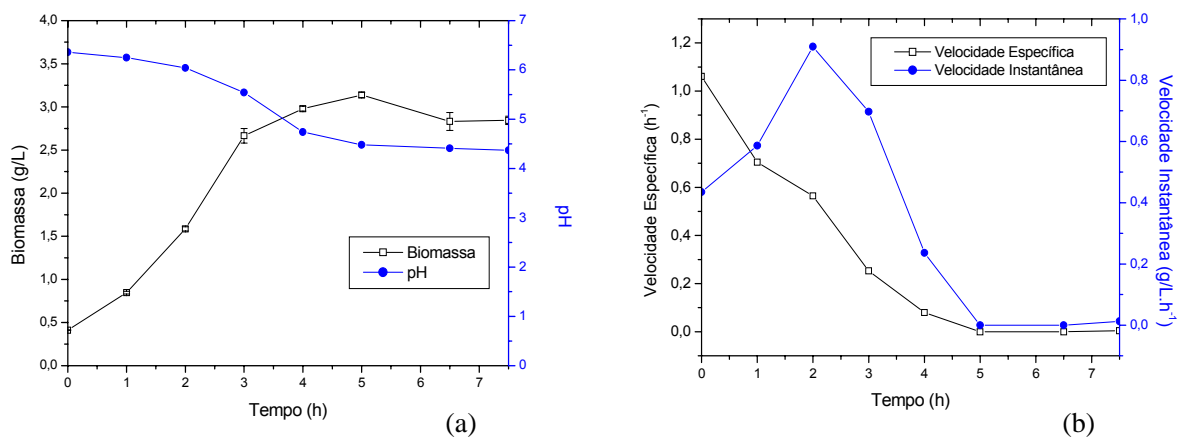


Figura 8 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 5; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 5.

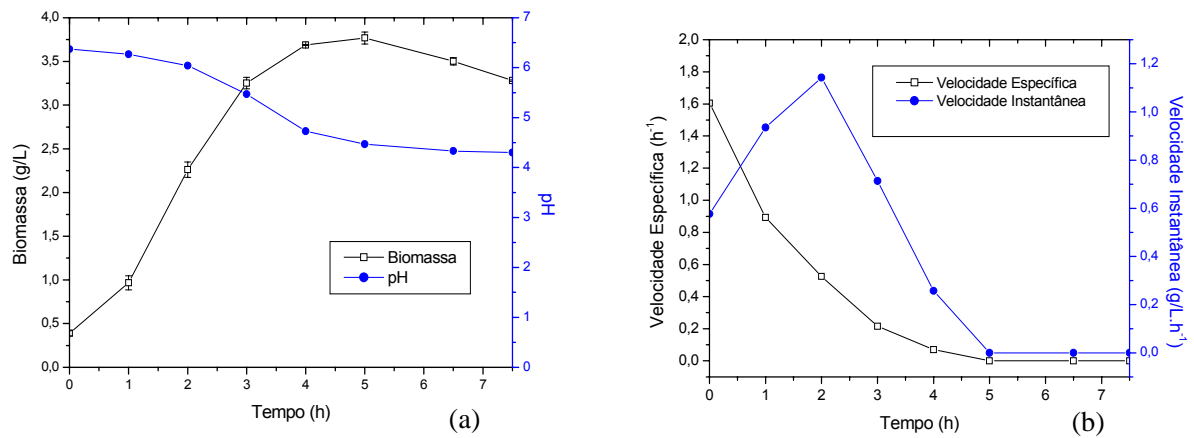


Figura 9 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 6; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 6.

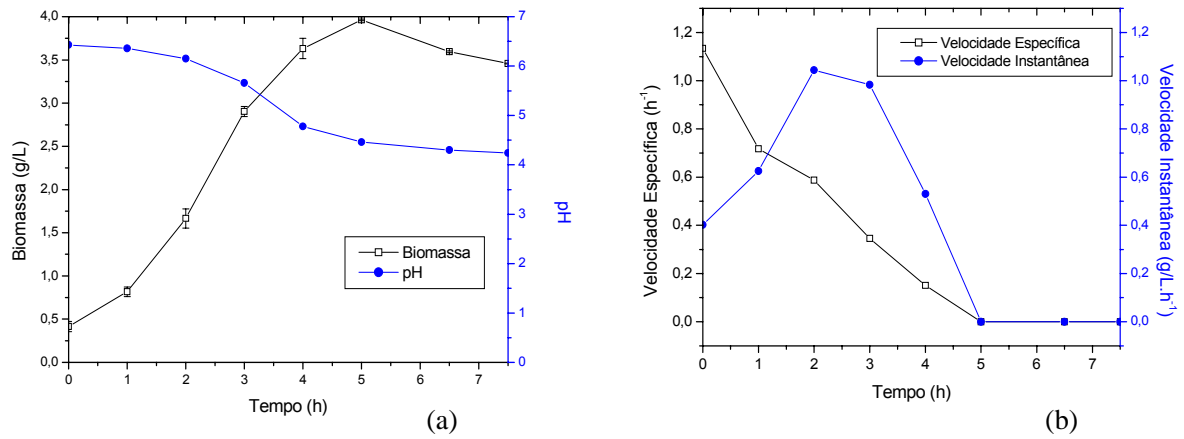


Figura 10 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 7; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 7.

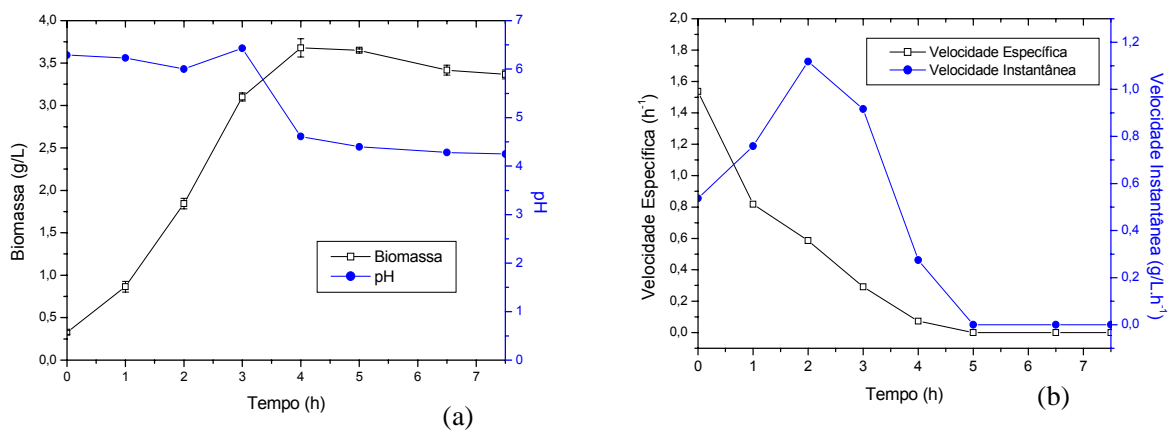


Figura 11 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 8; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 8.

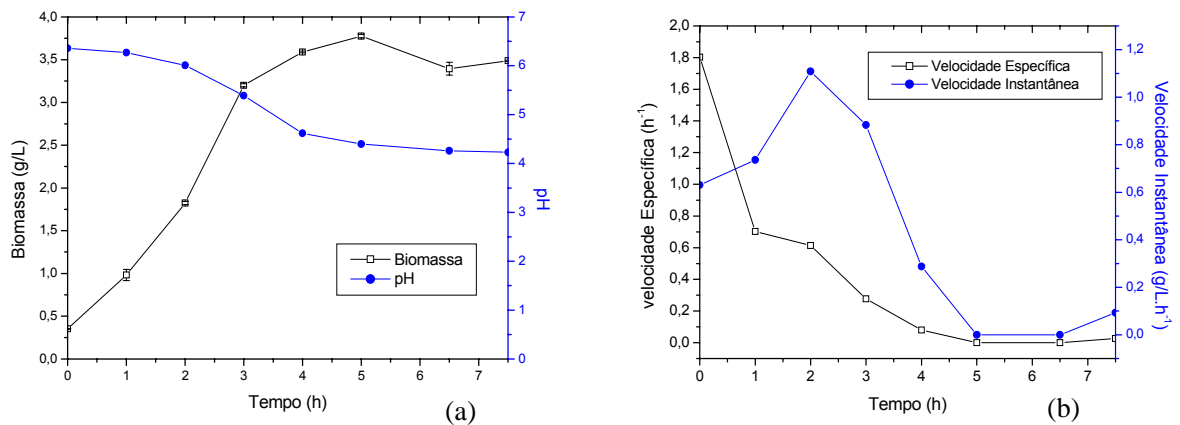


Figura 12 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 9; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 9.

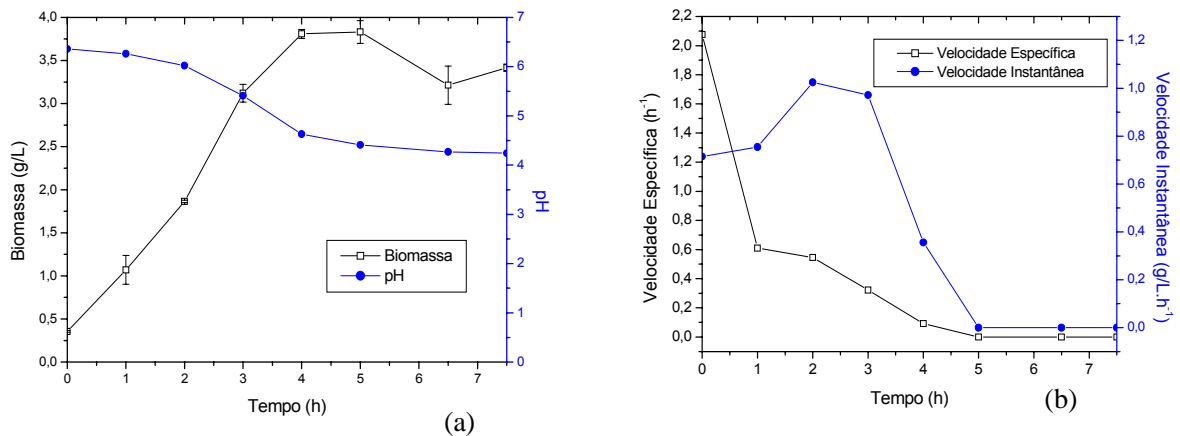


Figura 13 - (a) Perfil de biomassa e pH durante a fermentação do ensaio 10; (b) Perfil da velocidade específica e instantânea durante a fermentação do ensaio 10.

As Figuras de 3 a 13 mostram que o crescimento microbiano foi acelerado durante as primeiras horas de fermentação chegando à fase estacionária após aproximadamente 4 horas de fermentação para todas as condições estudadas. Não foi notada fase lag em nenhum dos ensaios. Esse comportamento indica uma boa adaptação do microrganismo aos meios de cultura contendo diversas combinações de extrato de levedura e sulfato de amônio. Isto mostra que o microrganismo estava, no momento da inoculação, na fase exponencial. Caso contrário, mesmo bem adaptado, o microrganismo apresentaria fase lag. A velocidade específica apresentou-se elevada no início da fermentação para todos os ensaios havendo um declínio no decorrer do tempo de fermentação. O meio controle apresentou menor velocidade específica de crescimento quando comparada com os demais ensaios.

Com relação à velocidade instantânea, foi verificado que a velocidade máxima de crescimento microbiano ocorreu entre 2 e 4 horas de fermentação sendo mais elevada nos meios contendo maiores quantidades de extrato de levedura. No meio controle a velocidade instantânea de crescimento foi a menor dentre todos os ensaios realizados, indicando que a adição de sulfato de amônia em combinação com o extrato de levedura favorece o crescimento microbiano.

A Tabela 14 apresenta as taxas máximas de crescimento específico ($\mu_{\text{máx.}}$) que foram obtidas a partir da regressão linear do gráfico $\ln(x)$ vs. (t) considerando a parte linear (fase exponencial da curva) através da seguinte equação:

$$\ln(x) = \mu_{\text{máx.}} \cdot t$$

$$x = \text{concentração de biomassa (g/L)} \quad (12)$$

Tabela 14 - Taxas máximas de crescimento específico para a otimização do meio de cultura

Ensaio	$\mu_{\text{máx.}}$ (h⁻¹)	Fase log (h)
Controle	0,69	0,5 - 3,0
1	0,64	0,5 - 2,5
2	0,66	0,5 - 2,0
3	0,67	0,5 - 2,5
4	0,68	0,5 - 2,5
5	0,61	0,5 - 2,5
6	0,74	0,5 - 2,5
7	0,70	0,5 - 2,5
8	0,68	0,5 - 3,0
9	0,62	0,5 - 3,0
10	0,62	0,5 - 3,0

Conforme resultados apresentados, não houve variação expressiva nas taxas máximas de crescimento específico, assim como na duração da fase log. Entretanto, o ensaio 6 apresentou uma taxa superior ao controle. A pequena variação encontrada nos ensaios indica que a utilização do sulfato de amônio não afetou negativamente o crescimento do microrganismo (Tabela 14).

Os resultados de biomassa apresentados na Tabela 11 foram analisados através do gráfico de superfície de resposta com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft). A Figura 14 apresenta a superfície de resposta obtida para a biomassa formada durante a fermentação (Eq. 11).

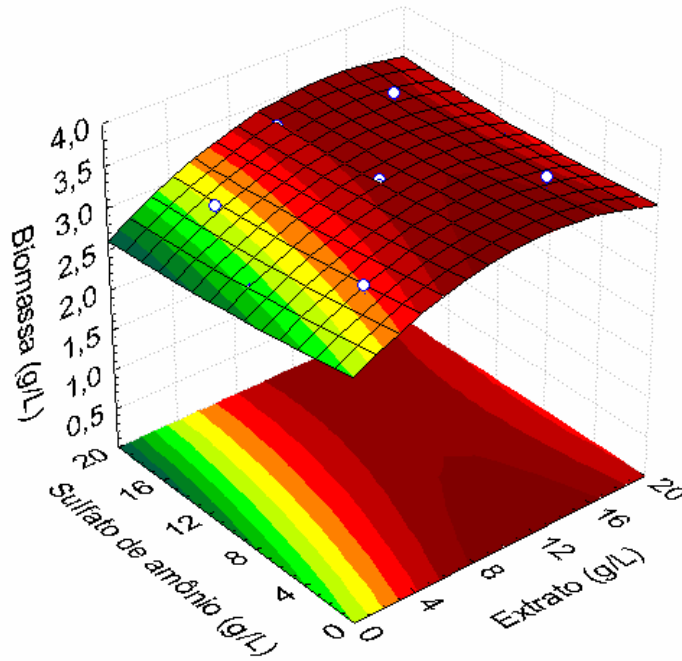


Figura 14 - Superfície de resposta para biomassa obtida em função da concentração de extrato de levedura e de sulfato de amônio.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 14, o extrato de levedura apresenta maior influência no crescimento microbiano do que o sulfato de amônio. A máxima biomassa obtida foi encontrada utilizando-se de 12g/L de extrato de levedura onde foi obtido aproximadamente 3,5 g/L células. Entretanto em concentrações de 4 g/L de extrato de levedura e 4 g/L de sulfato de amônio ocorreu uma produção de aproximadamente 3,3 g/L de biomassa, correspondendo a 82,5 % da biomassa formada no meio padrão (4,0 g/L) contendo apenas extrato de levedura (Figura 3) com fonte de nitrogênio. Portanto, é possível a utilização de um meio de cultura contendo uma menor quantidade de extrato de levedura em combinação com sulfato de amônio, obtendo-se uma redução nos custos já que o sulfato de amônio é economicamente interessante por apresentar um custo bastante inferior ao extrato de levedura.

Um estudo realizado por CHUNG e DAY (2002) com o *Leuconostoc mesenteroides* B742 mostrou que a produção de oligossacarídeos está associada ao crescimento microbiano.

Após a otimização do meio de cultura, foi realizado um ensaio fermentativo utilizando-se o meio otimizado composto por 4g/L de sulfato de amônio e 4g/L de extrato de levedura e o meio controle (meio padrão) sem controle de pH para avaliar a formação de biomassa, o pH, atividade enzimática e proteínas.

No ensaio realizado com sulfato de amônio, a taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx.}}$) apresentou um valor igual a $0,43 \text{ h}^{-1}$ e fase log de 4 horas. No ensaio controle, foi verificado um $\mu_{\text{máx.}}$ igual a $0,63 \text{ h}^{-1}$ e fase log de 3 horas. Ao compararmos estes resultados observamos que, apesar do menor valor encontrado no ensaio com sulfato de amônio, a fase log apresentou uma maior duração, indicando a possibilidade de uma maior produção de enzima.

As Figuras 15 e 16 apresentam os perfis de biomassa, pH, atividade enzimática e proteína durante a fermentação no ensaio realizado no meio otimizado contendo sulfato de amônio e no meio controle (contendo apenas extrato de levedura como fonte de nitrogênio).

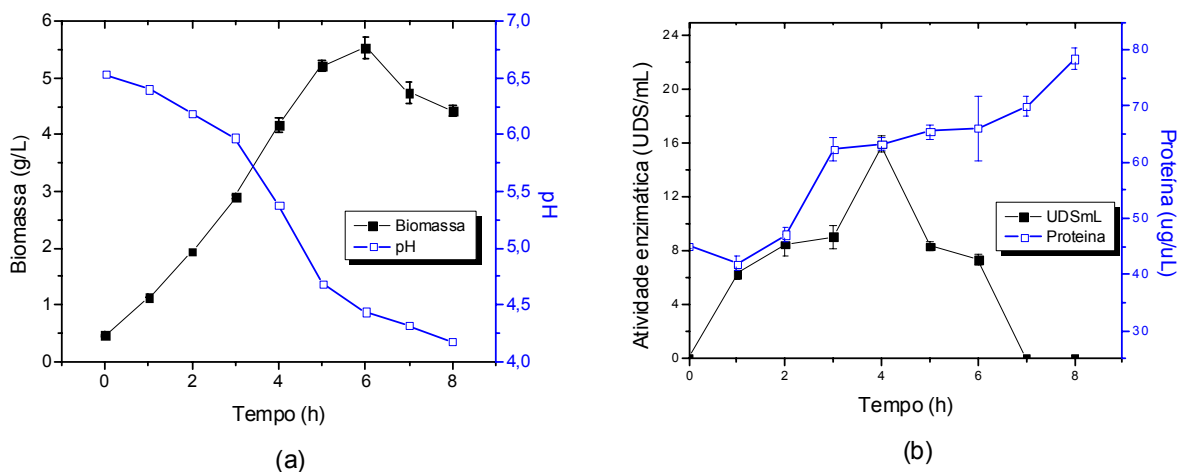


Figura 15 - Perfil de biomassa, pH (a), atividade enzimática e proteína (b) durante a fermentação no meio otimizado contendo sulfato de amônio sem controle de pH.

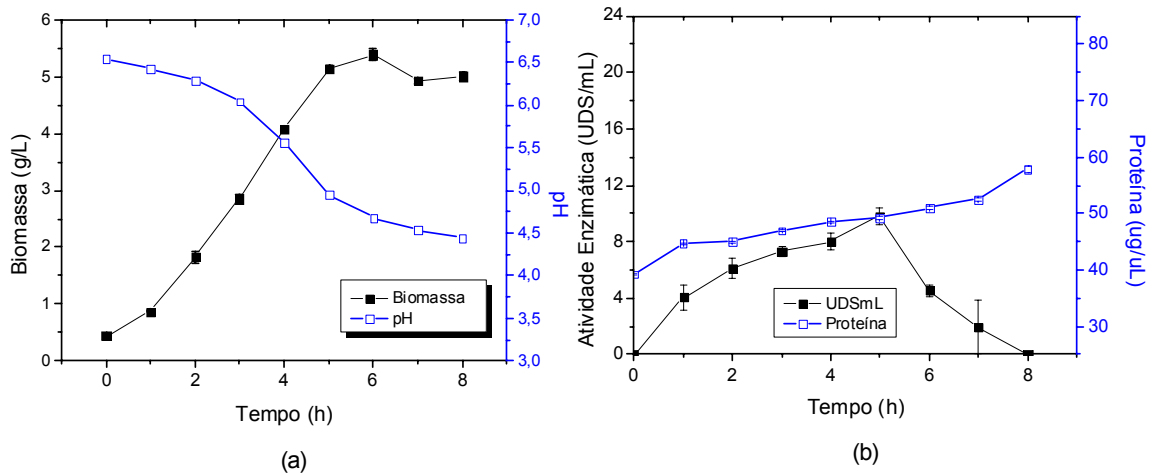


Figura 16 - Perfil de biomassa, pH (a), atividade enzimática e proteína (b) durante a fermentação no meio controle sem controle de pH.

De acordo com as Figuras 15 e 16, observa-se que tanto no meio otimizado (contendo 4g/L de sulfato de amônio e 4g/L de extrato de levedura) quanto no meio controle (contendo somente extrato de levedura) a biomassa aumenta no decorrer do tempo ao contrário do pH que decresce, enquanto que os perfis de biomassa e pH foram semelhantes nos dois ensaios. No meio otimizado, a atividade enzimática aumentou durante as quatro primeiras horas do ensaio onde apresentou um pico de $15,932 \pm 0,640$ UDS/mL, e a partir desse período houve queda da atividade enzimática. No meio controle houve o aumento da atividade enzimática até um pico de $9,83 \pm 0,565$ UDS/mL seguido de decréscimo. O pico de atividade enzimática ocorreu próximo ao final da fase exponencial de crescimento, sendo a queda na atividade enzimática acompanhada da queda do pH do meio de cultura, que ocorre devido a produção de ácido láctico pelo microrganismo. Esse comportamento foi também verificado por RODRIGUES *et al.* (2003) e CHAGAS *et al.* (2007) para o *L.mesenteroides* B512F. Segundo estes autores, a queda da atividade enzimática ocorre devido a desnaturação da enzima a baixos valores de pH do meio de cultura. Verificam-se também que a atividade enzimática foi maior no meio otimizado com sulfato de amônio, o que o torna bastante promissor para fins industriais. Nos dois ensaios (meio otimizado e controle), houve aumento da concentração de proteínas no decorrer do tempo, sendo verificados maiores valores no meio otimizado com sulfato de amônio.

Outro ensaio fermentativo foi realizado em pH controlado em $6,5 \pm 0,1$ utilizando-se o meio otimizado composto por 4g/L de sulfato de amônio para avaliar a formação de biomassa e atividade enzimática e proteínas. Foi observado que a taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx.}}$) apresentou um valor igual a $0,72 \text{ h}^{-1}$ e fase log de 4 horas, indicando que o controle do pH proporciona um crescimento microbiano a taxas mais elevadas.

A Figura 17 apresenta os perfis de biomassa, pH, atividade enzimática e proteínas durante a fermentação no ensaio realizado no meio otimizado contendo sulfato de amônio em pH controlado.

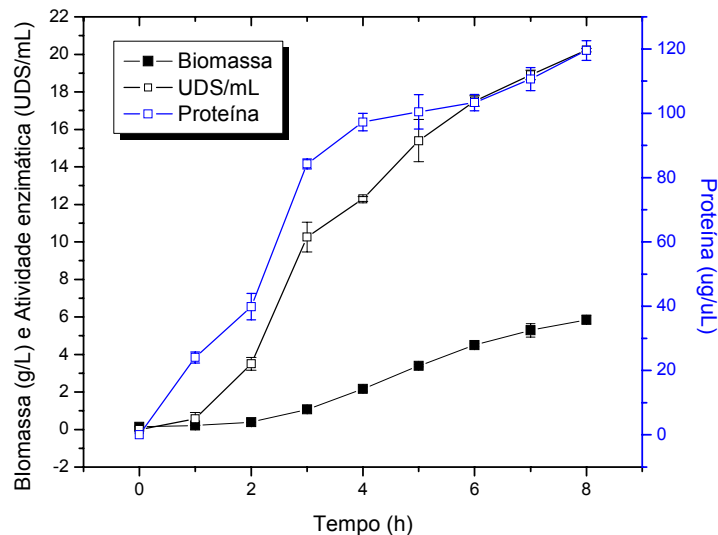


Figura 17 - Perfil de biomassa, atividade enzimática e proteína durante a fermentação no meio otimizado contendo sulfato de amônio em pH controlado.

A Figura 17 mostra que o crescimento microbiano não atingiu o estado estacionário como ocorreu no meio sem controle de pH, sendo obtidos valores finais de biomassa superiores aos obtidos para os ensaios sem controle de pH. Isso ocorreu, pois durante todo o ensaio foi mantido o pH ótimo de crescimento do microrganismo (6,5). A atividade enzimática aumentou acompanhando o crescimento do microrganismo, evidenciando que a produção da enzima é associada ao crescimento microbiano. Esse resultado é concordante com o observado para a linhagem *L.mesenteroides* B512F (RODRIGUES et al, 2003;

CHAGAS *et al.*, 2007). A concentração de proteínas aumentou no decorrer do tempo acompanhando também o crescimento microbiano, uma vez que a produção da enzima é associativa.

Comparando-se os ensaios fermentativos realizados no meio otimizado contendo sulfato de amônio e no meio controle em pH controlado e não controlado, observa-se que a fermentação realizada no meio otimizado em pH controlado foi melhor já que nestas condições houve maior formação de biomassa e proteína além de maior atividade enzimática.

4.3 Otimização das condições de determinação da atividade da enzima dextrana-sacarase

O microrganismo industrialmente utilizado tanto para a produção da enzima dextrana-sacarase, como para produção de dextrana, é o *Leuconostoc mesenteroides* B512F. Entretanto, a enzima, de origem bacteriana, pode ser obtida a partir de diversos microrganismos, dentre eles, a bactéria láctica *Leuconostoc mesenteroides* B742, que, no entanto, é pouco estudada, não tendo sido encontradas condições padronizadas e/ou otimizadas para a determinação da atividade enzimática da enzima dextrana-sacarase desta linhagem. Dessa forma, foi realizado um estudo para determinação das condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da enzima dextrana-sacarase produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* B742, considerando tempo de reação (incubação) de 30 e 60 minutos.

A Tabela 15 apresenta as condições experimentais e os resultados obtidos com a determinação da atividade enzimática nos tempo 30 e 60 minutos de acordo com o planejamento experimental apresentado no item 3.7.

Tabela 15 - Planejamento experimental e resultados obtidos de atividade enzimática em 30 e 60 minutos

Ensaio	pH da solução de atividade	Temperatura (°C)	Atividade 30 minutos (UDS/mL)	Atividade 60 minutos (UDS/mL)
1	5,5	25	11,735 ± 0,372	2,928 ± 1,705
2	5,5	35	8,195 ± 3,562	1,464 ± 0,503
3	6,5	25	19,375 ± 1,036	6,622 ± 0,219
4	6,5	35	30,747 ± 1,377	12,555 ± 0,492
5	5,5	30	1,879 ± 2,316	2,841 ± 2,229
6	6,5	30	21,788 ± 1,770	11,080 ± 0,153
7	6,0	25	22,793 ± 1,552	4,851 ± 0,197
8	6,0	35	22,312 ± 2,775	8,829 ± 0,066
9	6,0	30	23,842 ± 0,372	9,943 ± 0,481
10	6,0	30	17,045 ± 0,306	8,654 ± 2,032
11	6,0	30	14,292 ± 0,524	8,905 ± 1,781

A Tabela 16 apresenta os efeitos das variáveis independentes na atividade enzimática em 30 e 60 minutos.

Tabela 16 - Efeitos estimados para a atividade enzimática em 30 e 60 minutos

Fator	Atividade 30 minutos		Atividade 60 minutos	
	Efeito	S.E.	Efeito	S.E.
Média	18,07*	1,83*	8,90*	0,41*
pH(L)	16,70*	2,92*	7,67*	0,65*
pH(Q)	-11,52	4,49	-3,09*	1,00*
Temperatura (L)	2,45	2,92	2,82*	0,65*
Temperatura (Q)	9,92	4,49	-3,33*	1,00*
pH x Temperatura	7,46	3,58	3,70*	0,80*

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

De acordo com a Tabela 16, observa-se que no intervalo de confiança de 95%, o efeito linear do pH apresentou efeito significativo sobre a atividade enzimática em 30 minutos e todas as variáveis apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática em 60 minutos.

Os modelo de regressão obtidos para a atividade enzimática em 30 e 60 minutos estão expressos pelas equações 13 e 14, respectivamente.

$$\text{Atividade 30 minutos (UDS / mL)} = -471,9 + 248,4pH - 23,0pH^2 - 20,6T + 0,2T^2 + 1,49pH \cdot T \quad (13)$$

$$\text{Atividade 60 minutos (UDS / mL)} = -194,8 + 59,61pH - 6,18pH^2 - 1,6 \times 10^{-1}T - 7 \times 10^{-2}T^2 + 7,4 \times 10^{-1}pH \cdot T \quad (14)$$

Onde:

pH pH da solução de atividade

T Temperatura do ensaio

As análises de variância (ANOVA) para os modelos de regressão obtidos para a atividade enzimática em 30 e 60 minutos são apresentadas nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17 - Análise de variância para a atividade enzimática em 30 minutos (Eq. 13)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	598,94	5	119,79	9,37
Residual	63,95	5	12,79	
Total	662,89	10		
Coeficiente de determinação	0,90			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Tabela 18 - Análise de variância para a atividade enzimática em 60 minutos (Eq. 14)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	131,71	5	26,34	41,16
Residual	3,19	5	0,64	
Total	134,9	10		
Coeficiente de determinação	0,97			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

De acordo com as Tabelas de ANOVA, os valores de F calculados para os modelos de atividade enzimática em 30 e 60 minutos foram 9,37 e 41,16, respectivamente, ou seja maiores que o valor de $F_{5,4}$ Tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança, assim os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos, de acordo com o teste F .

Os resultados de atividade enzimática em 30 e 60 minutos apresentados na Tabela 15 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do software Statística 7.0 (Statsoft). As Figuras 18 e 19 apresentam as superfícies de respostas obtida para a atividade enzimática em 30 e 60 minutos (Eq. 13 e 14).

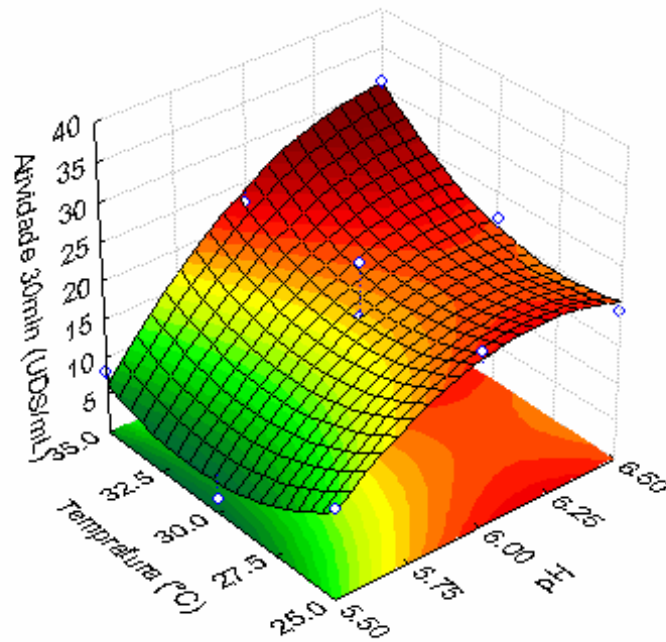


Figura 18 - Superfície de resposta para a atividade enzimática em 30 minutos.

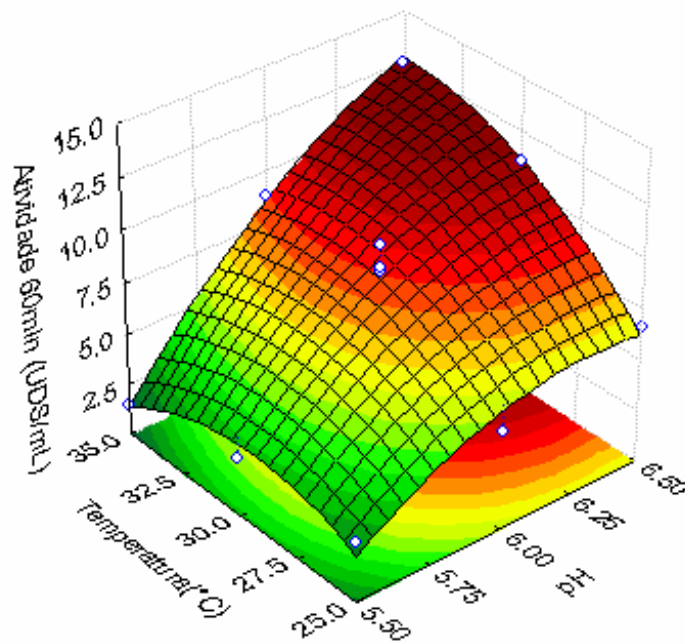


Figura 19 - Superfície de resposta para a atividade enzimática em 60 minutos.

De acordo com a superfície de resposta obtida para a atividade enzimática em 30 minutos (Figura 18), observa-se que o pH tem maior influência sobre a atividade enzimática que apresenta um aumento em valores de pH a partir de 6,0 e abaixo deste valor não é verificada a influência significativa do pH, indicando que a desnaturação da enzima pode ter ocorrido. A variação na temperatura, na faixa estudada, praticamente não tem influência na atividade enzimática, entretanto, a região ótima de atividade enzimática é obtida com a combinação de elevados valores de temperatura ($> 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) e pH ($> 6,25$). Em 30 minutos foi obtida uma atividade enzimática máxima de $30,747 \pm 1,377$ nas condições de pH 6,5 e temperatura de 35°C .

A análise de superfície de resposta para a atividade enzimática em 60 minutos (Figura 19), mostra que o pH apresenta grande influência sobre a atividade enzimática, pois uma elevação nos valores de pH ocasiona um aumento da atividade enzimática. A temperatura não apresenta influência sobre a atividade enzimática, já que o aumento da mesma não resulta no aumento da atividade enzimática. Entretanto a interação entre temperatura e pH foi significativa, pois o aumento simultâneo destes dois parâmetros promove aumento da atividade enzimática.

Novamente, a região ótima de atividade enzimática é obtida com a combinação de elevados valores de temperatura e pH. No intervalo de tempo de 60 minutos, a enzima apresentou menor atividade, sendo obtida uma atividade enzimática máxima de $12,555 \pm 0,492$ nas condições de pH 6,5 e temperatura de 35°C.

Observa-se que a atividade enzimática diminuiu para o ensaio realizado em 60 minutos. Esta variação pode ser atribuída à desnaturação da enzima (perda de estabilidade) ou pela diminuição da taxa de reação com o tempo. Como foi verificada uma maior atividade enzimática no tempo de 30 minutos em pH 6,5 e temperaturas entre 30 e 35°C, foi realizada uma nova fermentação e a determinação da atividade enzimática foi realizada nestas condições de pH e temperatura em intervalos de tempo de 10, 20 e 30 minutos, para avaliar a determinação da atividade enzimática em um menor intervalo de tempo. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos com a determinação de atividade enzimática nas temperaturas de 30 e 35°C, nos tempos de 10, 20 e 30 minutos.

Tabela 19 - Atividade enzimática obtida em pH 6,5 nas temperaturas de 30 e 35°C

Tempo (minutos)	Atividade enzimática (UDS/mL)	
	30°C	35°C
10	$89,620 \pm 8,851$	$58,217 \pm 2,321$
20	$48,186 \pm 0,197$	$24,683 \pm 2,917$
30	$26,224 \pm 0,131$	$23,864 \pm 1,442$

Os resultados obtidos na Tabela 19 mostram que no intervalo de tempo 10 minutos e na temperatura de 30°C, a enzima apresentou atividade máxima de $89,620 \pm 8,851$. Na temperatura de 35°C, a enzima apresentou perda de atividade cujo valor máximo obtido nessa temperatura foi de $58,217 \pm 2,321$ no tempo de 10 minutos. Observa-se que com o aumento do tempo e da temperatura ocorre redução da atividade enzimática. A partir dos resultados verifica-se que a atividade enzimática pode ser determinada em um menor intervalo de tempo (10 minutos) na temperatura de 30°C.

De acordo com os resultados obtidos para a otimização da atividade enzimática da dextrana-sacarase, foi verificado que as condições ótimas de atividade enzimática são pH 6,5 e temperatura de 30°C no intervalo de tempo de 10 minutos.

4.4 Estabilidade da enzima dextrana-sacarase quanto ao pH e temperatura

A fim de verificar a estabilidade da enzima em meio sintético otimizado, foi realizado um planejamento experimental variando-se o pH e a temperatura do ensaio. As Tabelas 20 e 21 apresentam as condições experimentais e os resultados da estabilidade da enzima durante 3 horas.

Tabela 20 - Planejamento experimental e resultados obtidos de atividade enzimática nos intervalos de tempo de 0,5 e 1 hora

Ensaio	pH	Temperatura(°C)	Atividade Enzimática (UDS/mL)	
			0,5 hora	1 hora
1	4,5	25	4,930 ± 0,748	5,537 ± 1,048
2	4,5	35	7,330 ± 3,966	9,802 ± 0,224
3	6,5	25	22,300 ± 1,048	15,480 ± 5,986
4	6,5	35	14,490 ± 1,230	10,500 ± 0,524
5	5,5	30	12,350 ± 1,871	10,250 ± 2,320

Tabela 21 - Planejamento experimental e resultados obtidos de atividade enzimática nos intervalos de tempo de 2 e 3 horas

Ensaio	pH	Temperatura(°C)	Atividade Enzimática (UDS/mL)	
			2 horas	3 horas
1	4,5	25	3,250 ± 0,524	2,960 ± 0,411
2	4,5	35	6,585 ± 1,497	5,088 ± 0,299
3	6,5	25	15,489 ± 4,265	13,560 ± 1,048
4	6,5	35	11,075 ± 1,197	7,650 ± 0,440
5	5,5	30	8,960 ± 0,217	6,780 ± 1,170

A Tabela 22 apresenta os efeitos das variáveis independentes (pH e temperatura) na atividade enzimática no período de 0,5 a 2 horas.

Tabela 22 - Efeitos estimados para a atividade enzimática no período de 0,5 a 2 horas

Fator	Atividade enzimática					
	0,5 hora		1 hora		2 horas	
	Efeito	S.E.	Efeito	S.E.	Efeito	S.E.
Média	12,28*	0,03*	10,31*	0,03*	9,07*	0,06*
pH	12,27*	0,08*	5,32*	0,07*	8,36*	0,12*
Temperatura	-2,71*	0,08*	-0,36	0,07	-0,54	0,12
pH x Temperatura	-5,11*	0,08*	-4,62*	0,07*	-3,87*	0,12*

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

De acordo com a Tabela 22, observa-se que no intervalo de confiança de 95%, todas as variáveis apresentam efeito significativo sobre a atividade enzimática em 0,5 hora de ensaio. Nos períodos de 1 e 2 horas, a temperatura não apresentou efeito significativo, já o pH e a interação de pH e temperatura apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática.

Os modelos de regressão obtidos para a atividade enzimática no período de 0,5 a 2 horas são expressos pelas equações 15 a 17, respectivamente.

$$\text{Atividade } 0,5\text{ hora (UDS / mL)} = -97,57 + 21,45 \text{ pH} + 2,54T - 0,51 \text{ pH} \cdot T \quad (15)$$

$$\text{Atividade } 1 \text{ hora (UDS / mL)} = -79,52 + 16,53 \text{ pH} + 2,51T - 0,46 \text{ pH} \cdot T \quad (16)$$

$$\text{Atividade } 2 \text{ horas (UDS / mL)} = -76,25 + 15,81 \text{ pH} + 2,08T - 0,39 \text{ pH} \cdot T \quad (17)$$

Onde:

pH pH da solução de atividade

T Temperatura do ensaio

As análises de variância (ANOVA) para os modelos de regressão obtidos para atividade enzimática no período de 0,5 a 2 horas são apresentadas nas Tabelas 23 a 25, respectivamente.

Tabela 23 - Análise de variância para atividade enzimática em 0,5 hora (Eq.15)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	183,8	3	61,27	6127,00
Residual	0,01	1	0,01	
Total	183,81	4		
Coeficiente de determinação	1,00			
F Tabelado (95%)				$F_{3,1} = 215,71$

Tabela 24 - Análise de variância para a atividade enzimática em 1 hora (Eq.16)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	49,8	3	16,6	1660,00
Residual	0,01	1	0,01	
Total	49,81	4		
Coeficiente de determinação	1,00			
F Tabelado (95%)				$F_{3,1} = 215,71$

Tabela 25 - Análise de variância para a atividade enzimática em 2 horas (Eq.17).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	85,27	3	28,42	1421,00
Residual	0,02	1	0,02	
Total	85,29	4		
Coeficiente de determinação	1,00			
F Tabelado (95%)				$F_{3,1} = 215,71$

De acordo com as Tabelas ANOVA, os valores de F calculados para os modelos de atividade enzimática em 0,5, 1 e 2 horas foram 6127,00, 1660,00 e 1421,00, respectivamente. Esses valores são maiores que o valor de $F_{3,1}$ Tabelado (215,71) no intervalo de 95% de confiança, assim os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos, de acordo com o teste F .

O modelo de regressão para a atividade enzimática em 3 horas não foi estatisticamente significativo no intervalo de confiança de 95%, portanto as Tabelas referentes aos efeitos das variáveis e à análise de variância (ANOVA) são apresentadas no ANEXO 2.

Os resultados de atividade enzimática no período de 0,5 a 2 horas apresentados nas Tabelas 20 e 21 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta que são apresentados nas Figuras 20 a 22 (Eq. 15 a 17).

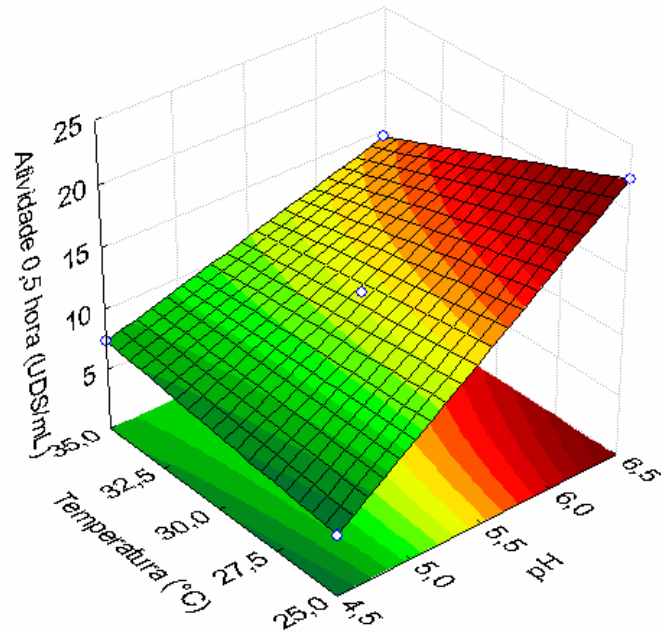


Figura 20 - Superfície de resposta para a estabilidade enzimática em 0,5 hora.

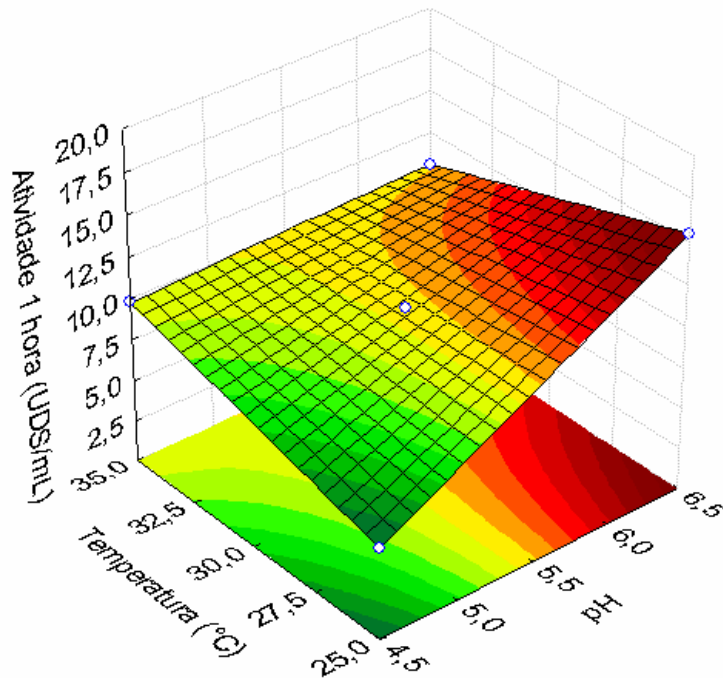


Figura 21 - Superfície de resposta para a estabilidade enzimática em 1 hora.

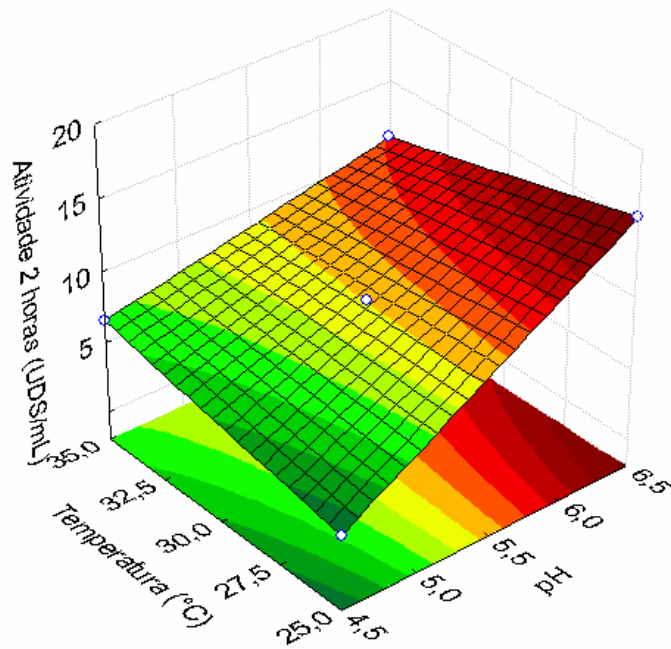


Figura 22 - Superfície de resposta para a estabilidade enzimática em 2 horas.

De acordo com as superfícies de respostas obtidas para a atividade enzimática em 0,5, 1 e 2 horas (Figuras 20, 21 e 22), observa-se que o pH tem influência sobre a atividade enzimática, pois o aumento dos valores de pH causa aumento da atividade enzimática, isso pode ser verificado em valores de pH superiores a 6,0. Entretanto, a diminuição dos valores de pH causam um decréscimo na atividade enzimática, pois a redução do pH pode causar a desnaturação da enzima. A temperatura não tem influência na atividade, pois o aumento da temperatura não causa aumento da atividade enzimática, em valores elevados de temperatura pode ocorrer desnaturação da enzima. A região ótima de atividade enzimática nos períodos de 0,5, 1 e 2 horas é obtida em pH 6,5 e temperatura de 25°C, condição na qual a enzima apresentou atividade máxima de $22,300 \pm 1,048$ no período de 0,5 hora, $15,480 \pm 5,986$ no período de 1 hora e $15,489 \pm 4,265$ no período de 2 horas, observando-se assim que a enzima manteve estável.

A Figura 23 apresenta a estabilidade da enzima em meio sintético no período de 3 horas. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa que é calculada através da razão entre a atividade enzimática obtida em cada intervalo de tempo e a atividade enzimática inicial.

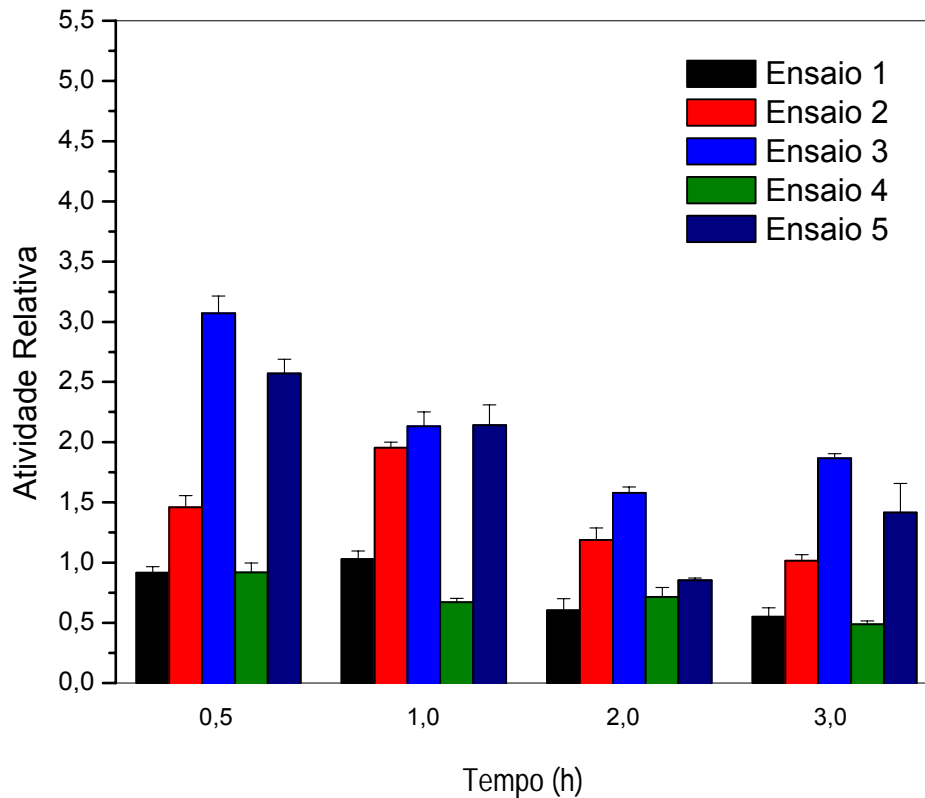


Figura 23 - Estabilidade da enzima dextrana-sacarase em meio sintético durante 3 horas.

Onde,

Ensaio 1 – pH 4,5 e Temperatura de 25°C

Ensaio 2 – pH 4,5 e Temperatura de 35°C

Ensaio 3 – pH 6,5 e Temperatura de 25°C

Ensaio 4 – pH 6,5 e Temperatura de 35°C

Ensaio 5 – pH 5,5 e Temperatura de 30°C

De acordo com a Figura 23, observa-se que no ensaio 1, a enzima apresenta perda de aproximadamente 50% da estabilidade a partir de 2 horas. No ensaio 2, ocorre um aumento da atividade enzimática relativa no período de 1 hora, seguido

de um decréscimo nos períodos de 2 e 3 horas. Nos ensaios 3 e 5 ocorreu um decréscimo da atividade relativa nos períodos de 1 e 2 horas seguido de um acréscimo durante 3 horas de ensaio. No ensaio 4, observa-se que a enzima apresentou perda de estabilidade a partir de 1 hora. A Figura 23 mostra que a enzima apresentou estabilidade nos ensaios 2, 3 e 5, por um período de 3 horas.

O acréscimo e decréscimo da atividade enzimática relativa foi relatado por HONORATO e RODRIGUES (2008) em estudo da estabilidade da enzima dextran-sacarase em suco de caju utilizando o *Leuconostoc mesenteroides* B512F. Em estudo realizado por GIRARD e LEGOY (1999) com a enzima dextran-sacarase liofilizada obtida do *Leuconostoc mesenteroides* B512F na presença de solventes orgânicos como: dimetilsulfoxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), etanol, acetona e acetonitrila, o acréscimo e decréscimo da atividade relativa foi causado por mudanças na conformação da enzima quando entrou em contato com os solventes orgânicos. Quando a conformação da enzima ainda não é estável, a atividade enzimática relativa diminui e quando a conformação da enzima finalmente se torna estável, ocorre o aumento da atividade. Dessa forma, as oscilações de atividade se devem ao ajuste da formação devido à alteração de pH e temperatura.

Os resultados obtidos com a enzima dextran-sacarase no meio sintético, mostram que esta apresenta maior estabilidade em faixas de pH entre 4,5 e 6,5, sendo este último, o melhor valor de pH uma vez que é também o pH ótimo de atividade da enzima. A enzima apresenta boa estabilidade em faixas de temperatura entre 25 e 35°C, entretanto a 35°C a atividade enzimática é reduzida no pH 6,5. Desta forma, o uso combinado de pH 6,5 e temperatura de 25°C é o mais favorável para a síntese de oligossacarídeos, uma vez que é necessário que a enzima apresente atividade e se mantenha estável.

A partir dos resultados de estabilidade da enzima no meio sintético, foi realizado um estudo para avaliar a estabilidade da enzima no suco de caju em pH 6,5, variando-se a temperatura em 25 e 30°C durante um período de 48 horas. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa. A Figura 24 apresenta a estabilidade da enzima no suco de caju no período de 48 horas.

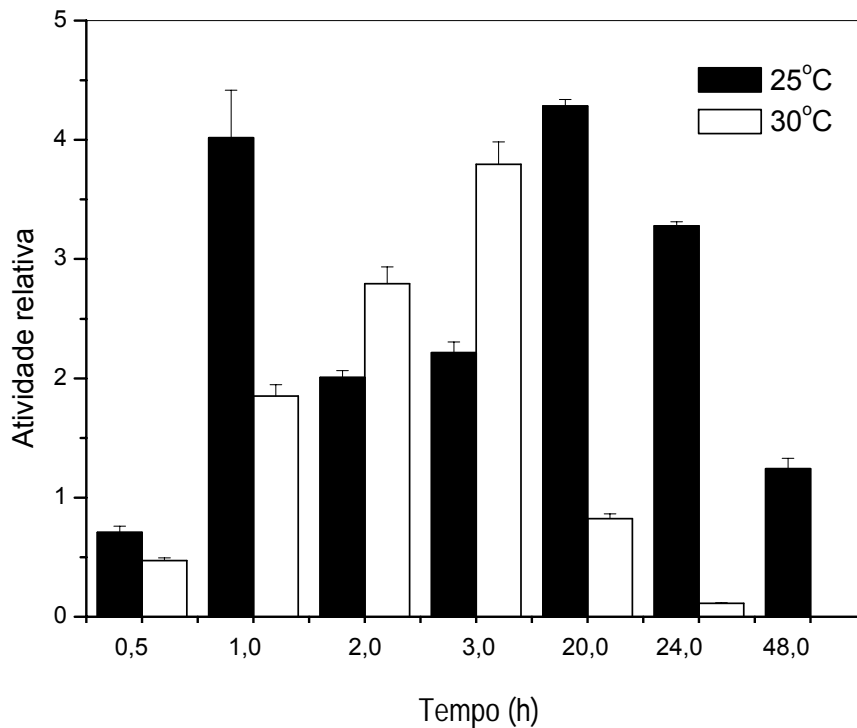


Figura 24 - Estabilidade da enzima dextrana-sacarase em suco de caju durante 48 horas (pH 6,5).

De acordo com a Figura 24, observa-se que na temperatura de 25°C a atividade relativa aumenta em 1 hora de ensaio e diminui em 2 horas. No período de 3 a 20 horas, ocorre novamente um aumento da atividade relativa, seguido de decréscimo até 48 horas de ensaio. Na temperatura de 30°C, ocorre um aumento da atividade relativa no período de 3 horas de ensaio, a partir desse período a atividade relativa diminui chegando a zero em 48 horas de ensaio. No meio sintético, também ocorreu esse acréscimo e decréscimo da atividade relativa (Figura 23). Os valores de atividade relativa a 25°C foram mais elevados do que a 30°C, além disso, a 25°C a enzima apresentou uma boa estabilidade até 48 horas de ensaio, enquanto a 30°C foi verificado que a enzima apresentou estabilidade somente nas três primeiras horas de ensaio, havendo perda significativa de atividade entre 20 e 24 horas.

Comparando os resultados da estabilidade da enzima no meio sintético e no suco de caju observa-se que no suco de caju a enzima apresenta estabilidade por um período mais prolongado do que no meio sintético, além de apresentar uma atividade relativa mais elevada. Um estudo realizado por HONORATO e RODRIGUES (2008) no suco de caju mostrou que a enzima obtida a partir do

Leuconostoc mesenteroides B512 apresentou maior estabilidade do que a enzima obtida com a linhagem B742. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as melhores condições para a manutenção da estabilidade da enzima são pH 6,5 e temperatura de 25°C, e que o suco de caju pode ser utilizado industrialmente como substrato para esta enzima em processos industriais, pois apresenta boa estabilidade no fermentado bruto.

4.5 Síntese enzimática de oligossacarídeos prebióticos

A síntese enzimática dos oligossacarídeos prebióticos foi realizada com a enzima bruta produzida no suco de caju durante o período de 72 horas. A Tabela 25 apresenta as condições experimentais do ensaio e os resultados com relação aos oligossacarídeos prebióticos, a dextrana, e os rendimentos em oligossacarídeos e dextrana. Na Tabela 27 são apresentadas as condições experimentais do ensaio e os resultados com relação aos açúcares redutores e açúcares totais consumidos. Os resultados apresentados consideram o residual de açúcar redutor do suco fermentado (23,26 g/L).

A dextrana e os açúcares redutores residuais foram determinados experimentalmente. Já os açúcares redutores consumidos, açúcares totais consumidos, oligossacarídeos prebióticos e os rendimentos em dextrana e em oligossacarídeos foram calculados através de balanço de massa, por isso os desvios padrões não são apresentados para estas grandezas.

Tabela 26 - Planejamento experimental e resultados obtidos de oligossacarídeos prebióticos, dextrana, e rendimentos em oligossacarídeos e dextrana

Ensaio	Sac (g/L)	A R (g/L)	Oligo (g/L)	Dextrana (g/L)	Y _{OLIG} (%)	Y _{DXT} (%)
1	25,00	62,50	38,982	48,596± 2,187	44,511	55,489
2	25,00	125,00	106,995	32,025 ±1,560	76,964	23,036
3	75,00	62,50	58,159	74,563 ±3,260	43,820	56,180
4	75,00	125,00	134,471	53,145±2,392	71,674	28,326
5	25,00	93,75	84,190	31,069±1,263	73,044	26,956
6	75,00	93,75	103,988	52,319±2,360	66,528	33,472
7	50,00	62,50	55,865	53,963±2,569	50,866	49,134
8	50,00	125,00	127,151	46,523±2,089	73,212	26,788
9	50,00	93,75	91,150	48,290±2,145	65,369	34,631
10	50,00	93,75	93,440	47,638±2,123	66,233	33,767
11	50,00	93,75	93,228	46,894±2,094	66,534	33,466

Tabela 27 - Planejamento experimental e resultados obtidos de açúcares redutores e totais consumidos

Ensaio	Sac (g/L)	AR (g/L)	AR _{cons} (g/L)	AT _{cons} (g/L)
1	25,00	62,50	62,578	87,578
2	25,00	125,00	114,020	139,020
3	75,00	62,50	57,722	132,722
4	75,00	125,00	112,616	187,616
5	25,00	93,75	90,259	115,259
6	75,00	93,75	81,307	156,307
7	50,00	62,50	59,828	109,828
8	50,00	125,00	123,674	173,674
9	50,00	93,75	89,440	139,440
10	50,00	93,75	91,078	141,078
11	50,00	93,75	90,122	140,122

A Tabela 28 apresenta os efeitos das variáveis independentes (sacarose e açúcares redutores) na concentração e rendimento de oligossacarídeos e de dextrana.

Tabela 28 - Efeitos estimados para concentração e rendimento de oligossacarídeos e dextrana

Fator	Oligo.		Dextrana		Y _{OLIGO}		Y _{DXT}	
	Efeito	S.E.	Efeito	S.E.	Efeito	S.E.	Efeito	S.E.
Média	94,36*	1,65*	45,98*	2,12*	67,42*	1,66*	32,58*	1,66*
Sac(L)	22,15*	2,62*	22,78*	3,37*	-4,17	2,64	4,17	2,64
Sac (Q)	-5,81	4,03	-3,67	5,19	0,60	4,06	-0,60	4,06
A R(L)	71,87*	2,62*	-15,14*	3,37*	27,55*	2,64*	-27,55*	2,64*
A R (Q)	-10,97*	4,03*	13,43*	5,19*	-14,89*	4,06*	14,89*	4,06*
Sac x A R	4,15	3,21	-2,42	4,13	-2,30	3,23	2,30	3,23

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

De acordo com a Tabela 28, observa-se que no intervalo de confiança de 95% o efeito linear da sacarose e dos açúcares redutores apresentaram-se significativos sobre os oligossacarídeos e a dextrana. Somente os açúcares redutores apresentaram efeito significativo sobre o rendimento em oligossacarídeos e em dextrana.

A Tabela 29 apresenta os efeitos das variáveis independentes (sacarose e açúcares redutores) nos açúcares redutores consumidos e açúcares totais consumidos.

Tabela 29 - Efeitos estimados para os açúcares redutores consumidos e açúcares totais consumidos

Fator	AR _{cons}		AT _{cons}	
	Efeito	S.E.	Efeito	S.E.
Média	90.34*	1.64*	140.34*	1.64*
Sac(L)	-5.07	2.60	44.93*	2.60*
Sac (Q)	-9.48	4.01	-9.48	4.01
A R(L)	56.73*	2.60*	56.73*	2.60*
A R (Q)	2.46	4.01	2.46	4.01
Sac x A R	1.73	3.19	1.73	3.19

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

A Tabela 29 mostra que apenas o efeito linear da concentração de açúcares redutores iniciais apresenta sobre os açúcares redutores consumidos e que a sacarose linear e os açúcares redutores apresentam efeito significativo sobre o açúcar total consumido no intervalo de confiança de 95%.

Os modelos de regressão obtidos para a concentração e rendimento dos oligossacarídeos prebióticos e dextrana, bem como para os açúcares redutores e totais consumidos são expressos pelas equações 18 a 23, respectivamente.

$$\text{Oligossacarídeos}(g / L) = -84,15 + 0,66S - 4 \times 10^{-3} S^2 + 2,07AR - 5 \times 10^{-3} AR^2 + 2 \times 10^{-3} S \cdot AR \quad (18)$$

$$\text{Dextrana}(g / L) = 91,75 + ,89S - 2 \times 10^{-3} S^2 - 1,45AR + 6 \times 10^{-3} AR^2 - 1 \times 10^{-3} S \cdot AR \quad (19)$$

$$Y_{\text{OLIG}} (\%) = -42,46 + 6 \times 10^{-3} S + 5 \times 10^{-4} S^2 + 1,94AR - 7 \times 10^{-3} AR^2 - 1 \times 10^{-3} S \cdot AR \quad (20)$$

$$Y_{\text{DXT}} (\%) = 142,46 - 6 \times 10^{-3} S - 5 \times 10^{-4} S^2 - 1,94AR + 7 \times 10^{-3} AR^2 + 1 \times 10^{-3} S \cdot AR \quad (21)$$

$$A R \text{ consumido } (g/L) = 7,6 + 0,55S - 7 \times 10^{-3} S^2 + 0,62AR + 1 \times 10^{-3} AR^2 + 1 \times 10^{-3} S \cdot AR \quad (22)$$

$$A T \text{ consumido } (g/L) = 7,6 + 1,55S - 7 \times 10^{-3} S^2 + 0,62AR + 1 \times 10^{-3} AR^2 + 1 \times 10^{-3} S \cdot AR \quad (23)$$

As análises de variância (ANOVA) para os modelos de regressão obtidos para a concentração e rendimento de oligossacarídeos prebióticos e dextrana, bem como para os açúcares redutores e totais consumidos são apresentadas nas Tabelas 30 a 35, respectivamente.

Tabela 30 - Análise de variância para os oligossacarídeos prebióticos (Eq. 18)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	8629,51	5	1725,90	167,56
Residual	51,53	5	10,30	
Total	8681,04	10		
Coeficiente de determinação	0,99			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Tabela 31 - Análise de variância para a dextrana (Eq. 19)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	1242,44	5	248,488	14,58
Residual	85,19	5	17,04	
Total	1327,63	10		
Coeficiente de determinação	0,94			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Tabela 32 - Análise de variância para rendimento em oligossacarídeos (Eq. 20)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	1318,13	5	263,63	25,25
Residual	52,19	5	10,44	
Total	1370,32	10		
Coeficiente de determinação	0,96			
<i>F</i> Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Tabela 33 - Análise de variância para rendimento em dextrana (Eq. 21)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	1318,13	5	263,63	25,25
Residual	52,19	5	10,44	
Total	1370,32	10		
Coeficiente de determinação	0,96			
<i>F</i> Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Tabela 34 - Análise de variância para os açúcares redutores consumidos (Eq. 22)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	4925,43	5	985,09	96,86
Residual	50,87	5	10,17	
Total	4976,30	10		
Coeficiente de determinação	0,99			
<i>F</i> Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

Tabela 35 - Análise de variância para os açúcares totais consumidos (Eq. 23)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	7914,84	5	1582,97	155,65
Residual	50,87	5	10,17	
Total	7965,71	10		
Coeficiente de determinação	0,99			
<i>F</i> Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

De acordo com as Tabelas 30 a 35 que apresentaram a ANOVA para os modelos de regressão ajustados, os valores de F calculados para os modelos de concentração e rendimento de oligossacarídeos prebióticos e dextrana, bem como para os açúcares redutores consumidos e açúcares totais consumidos foram maiores que o valor de $F_{5,5}$ Tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança, assim os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos, de acordo com o teste F .

Os resultados de oligossacarídeos prebióticos, dextrana, rendimento em oligossacarídeos e dextrana apresentados na Tabela 26, bem como os resultados de açúcares redutores consumidos e açúcares totais consumidos apresentados na Tabela 27 foram analisados através de gráficos de superfície de resposta que são apresentados nas Figuras 25 a 30 (Eq. 18 a 23).

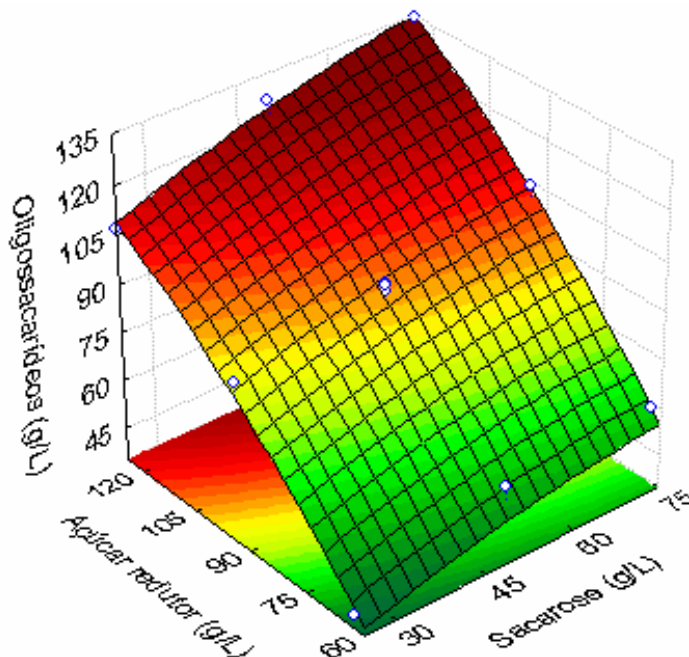


Figura 25 - Oligossacarídeos prebióticos obtidos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.

A análise de superfície de resposta para os oligossacarídeos prebióticos (Figura 25) mostra que a sacarose não tem muita influência sobre os oligossacarídeos prebióticos, pois o aumento das concentrações de sacarose não favorece o aumento de oligossacarídeos prebióticos, já que estes só podem ser formados se houver a combinação de sacarose e açúcares redutores. A formação de

oligossacarídeos é favorecida pelo aumento da concentração dos açúcares redutores e pela combinação de elevadas concentrações de sacarose e açúcares redutores. A influência dos açúcares redutores na formação dos oligossacarídeos se deve ao fato de que estes açúcares são os aceptores da reação de formação dos oligossacarídeos prebióticos. A maior concentração de oligossacarídeos (134,471g/L) foi obtida utilizando-se 75g/L de sacarose em combinação com 125g/L

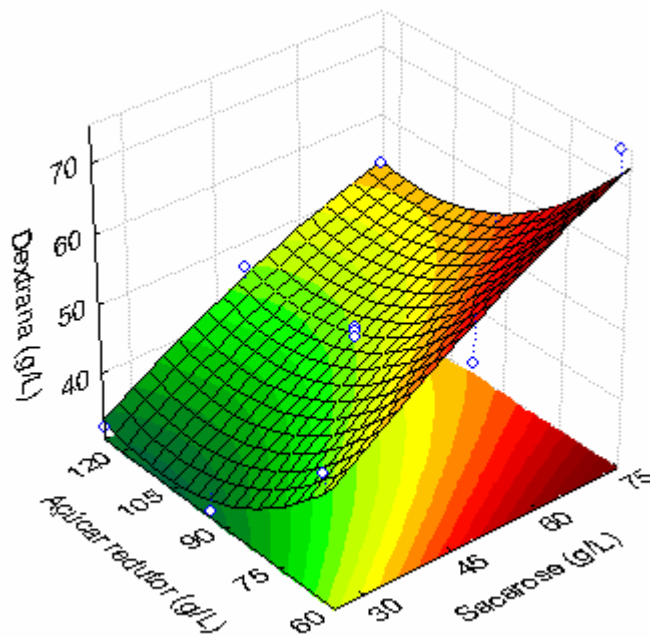


Figura 26 - Dextrana obtida em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 26, a síntese de dextrana é fortemente favorecida com o aumento da concentração de sacarose. A dextrana é formada a partir da sacarose, portanto quanto mais sacarose estiver disponível, mais dextrana será formada. O aumento da concentração de açúcares redutores desfavorece a síntese de dextrana, já que a presença desses açúcares no meio faz com que a formação de dextrana seja reduzida para que ocorra a produção de oligossacarídeos prebióticos. Portanto, a síntese de dextrana é maximizada quando são empregadas elevadas concentrações de sacarose em combinação com baixas concentrações de açúcares redutores. A maior concentração de dextrana (74,563 g/L) foi obtida utilizando-se concentrações de 75g/L de sacarose em

combinação com 62,50 g/L de açúcares redutores. Como a dextrana não é um produto de interesse neste trabalho, é indicado que sejam empregadas condições que desfavoreçam sua síntese.

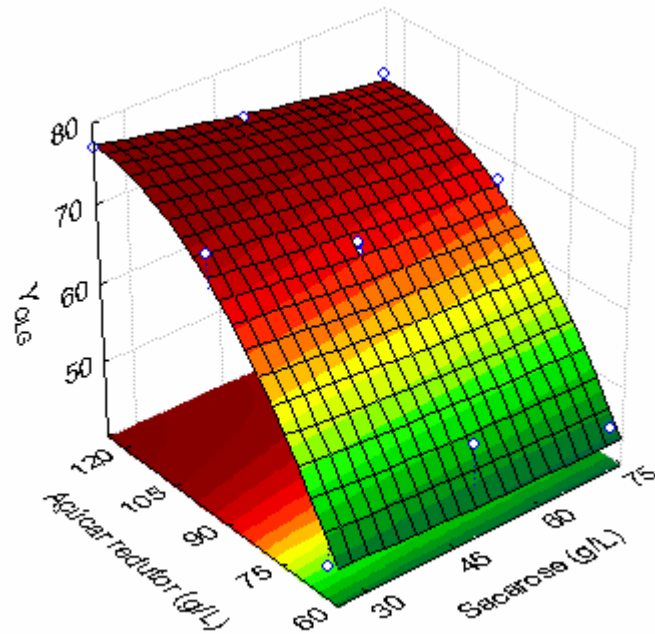


Figura 27 - Rendimento em oligossacarídeos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.

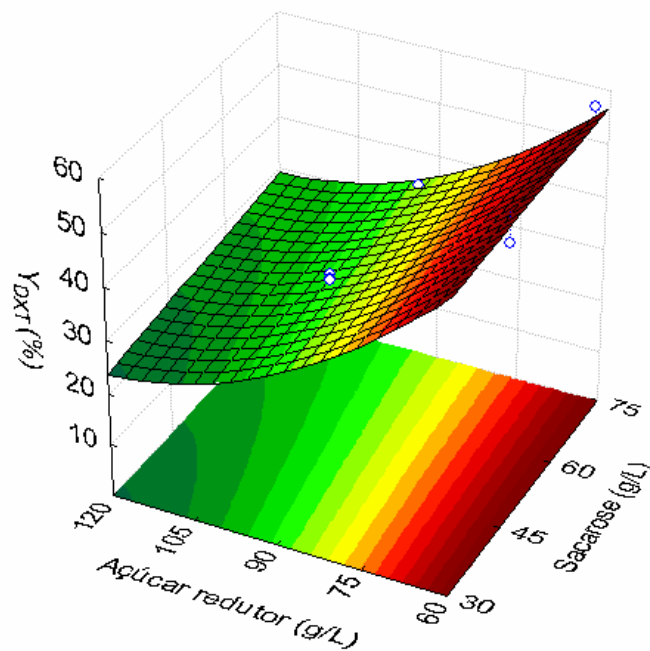


Figura 28 - Rendimento em dextrana em função da concentração de sacarose e açúcares redutores.

A Figura 27 mostra que o rendimento em oligossacarídeos é favorecido quando ocorre o aumento da concentração de açúcares redutores, isso ocorre porque os oligossacarídeos são formados a partir dos açúcares redutores. A sacarose não apresenta influência no rendimento dos oligossacarídeos pois um aumento não concentração de sacarose não causa aumento expressivo da concentração dos oligossacarídeos. Foi obtido um rendimento máximo em oligossacarídeos de 76,974% utilizando-se uma combinação de 25g/L de sacarose e 125 g/L de açúcares redutores. A superfície de resposta apresentada na Figura 28 mostra que a sacarose apresenta forte influência no rendimento em dextrana, isso ocorre porque a dextrana só é formada se a sacarose estiver presente no meio de reação. Os açúcares redutores apresentam efeito negativo no rendimento da dextrana já que o aumento da concentração de açúcares redutores minimiza o rendimento em dextrana. Isso ocorre porque a presença destes aceptores minimiza a formação de dextrana para que ocorra a formação de oligossacarídeos. Foi obtido um rendimento máximo em dextrana de 56,180% utilizando-se uma combinação de 75g/L de sacarose e 62,5g/L de açúcares redutores.

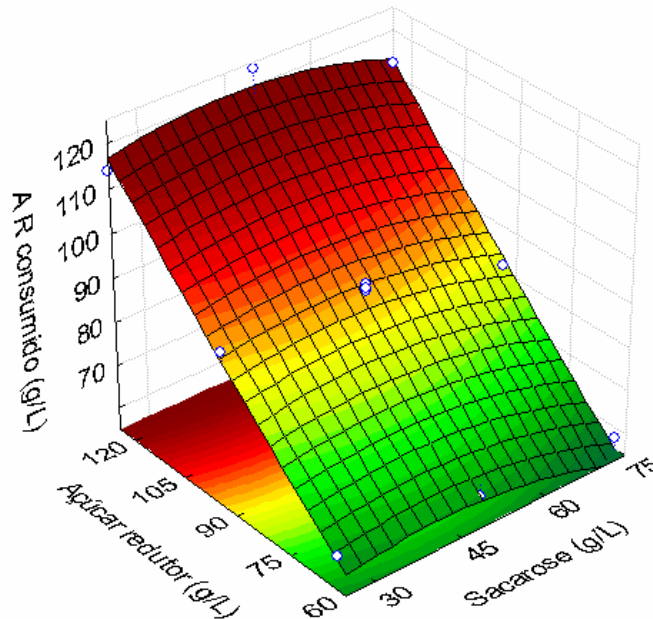


Figura 29 - Açúcares redutores consumidos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores iniciais.

De acordo com a Figura 29, observa-se que a sacarose não tem influência sobre os açúcares redutores consumidos na síntese de oligossacarídeos, pois um aumento da concentração de sacarose não causa aumento do consumo de

açúcares redutores. O aumento da concentração de açúcares redutores favorece o aumento da concentração de açúcares redutores consumidos, pois haverá uma maior quantidade de açúcares disponíveis para o consumo e formação de oligossacarídeos. Na síntese, aproximadamente 90% dos açúcares redutores foram consumidos, sendo esses resultados satisfatórios pois esse consumo de açúcares redutores se deve, principalmente, a formação de oligossacarídeos prebióticos, já que esses açúcares são aceptores da reação.

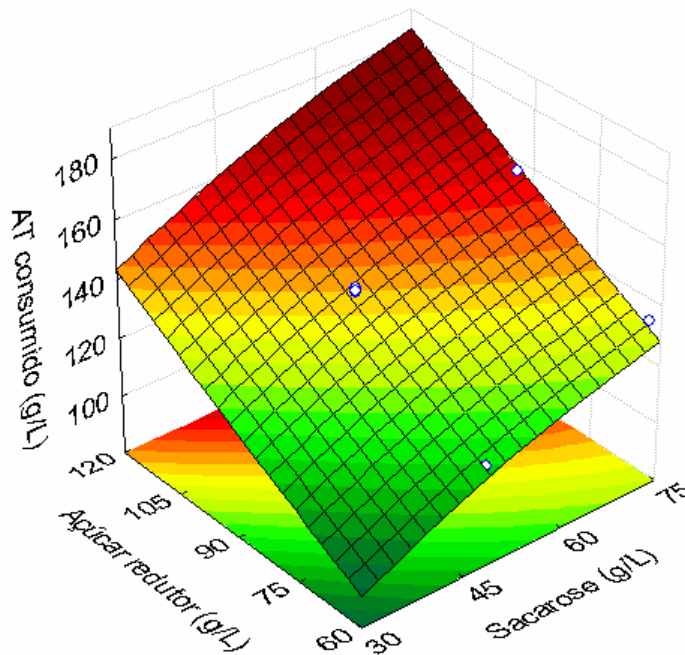


Figura 30 - Açúcares totais consumidos em função da concentração de sacarose e açúcares redutores iniciais.

A superfície de resposta obtida para os açúcares totais consumidos (Figura 30) mostra que o aumento tanto da concentração de sacarose como da concentração de açúcares redutores apresentam influência no consumo de açúcares totais, pois haverá uma maior quantidade de açúcares disponíveis para o consumo. A interação dessas variáveis em níveis elevados favorece o consumo de açúcares totais. Na síntese dos oligossacarídeos ocorreu um elevado consumo de açúcares totais, isso ocorreu porque esses açúcares foram convertidos a oligossacarídeos prebióticos e dextrana.

Os oligossacarídeos prebióticos formados, detectados através de cromatografia de camada delgada (CCD), são apresentados na Figura 31.

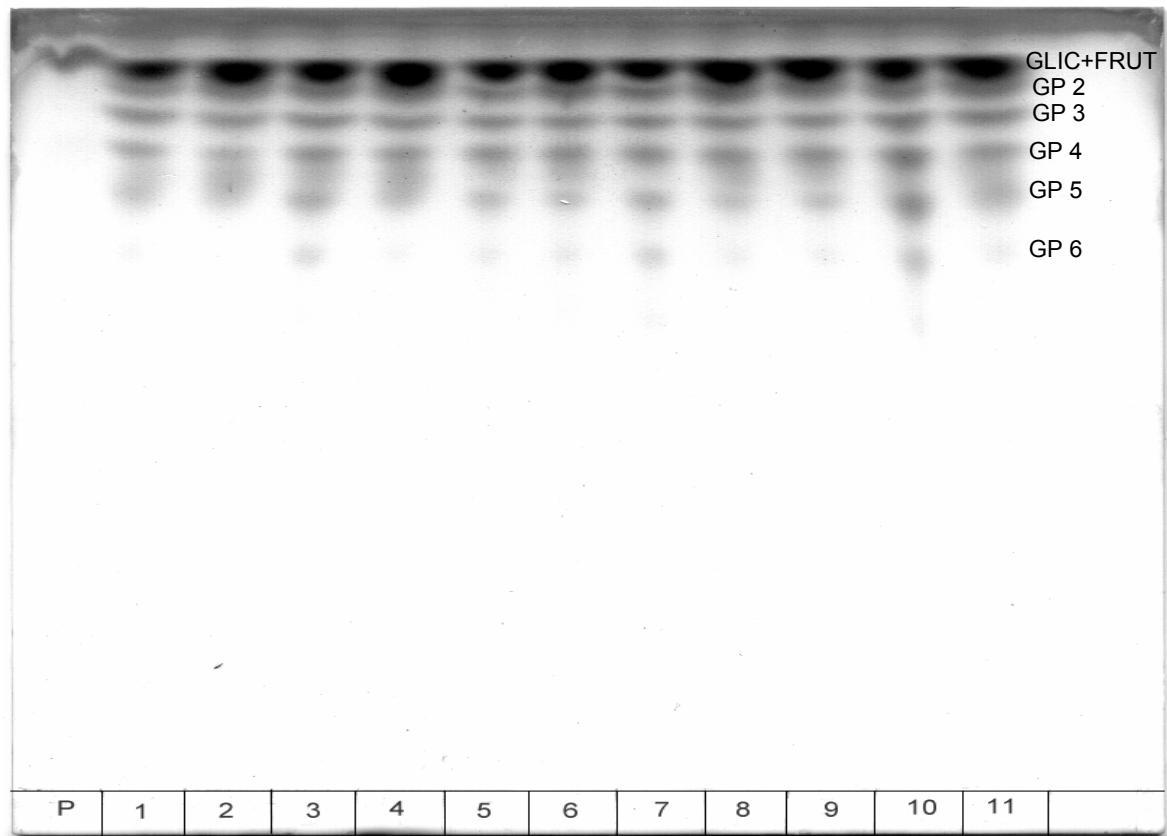


Figura 31 - Oligossacarídeos detectados através de cromatografia de camada delgada.

De acordo com a Figura 31, verifica-se que houve formação de oligossacarídeos prebióticos com graus de polimerização de 2 a 5 em todos os ensaios do planejamento experimental. Nos ensaios 3 (75,0 g/L de sacarose e 62,5 g/L de açúcares redutores), 7 (50,0 g/L de sacarose e 62,5 g/L de açúcares redutores) e 10 (50,0 g/L de sacarose e 93,5 g/L de açúcares redutores), verifica-se uma maior variedade de oligossacarídeos formados, com indicação de formação de oligossacarídeos com grau de polimerização 6 (GP6). No caso do ponto 10, que é uma replicata do ponto central, a maior intensidade da mancha correspondente ao GP6 pode ter ocorrido devido à aplicação de uma carga maior na placa, pois a mancha não é tão intensa nos pontos 9 e 11. Já no caso dos pontos 3 e 7 verifica-se que a razão AR/Sac situa-se na faixa de 0,83 e 1,25, respectivamente. Isso indica que quantidades próximas de açúcares redutores e sacarose levam ao aumento do grau de polimerização do oligossacarídeo, conforme verificado para a síntese de oligossacarídeos utilizando a linhagem *L.mesenteroides* B512F (VERGARA, 2007).

5 CONCLUSÕES

O suco de caju clarificado pode ser empregado como uma alternativa de substrato de baixo custo para o crescimento do *Leuconostoc mesenteroides* B742 e para a produção de oligossacarídeos prebióticos, uma vez apresentou em sua composição diversos minerais e uma quantidade expressiva de açúcares redutores, além disso, no processo fermentativo foi observado aumento da biomassa e produção da enzima dextrana-sacarase.

O uso combinado de extrato de levedura e sulfato de amônio constitui uma forma viável de redução do custo do meio de cultura, pela utilização de concentrações menores de extrato de levedura sem redução apreciável do crescimento microbiano e sem prejuízo à produção da enzima.

As condições ótimas de atividade da enzima dextrana-sacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* B742 são pH 6,5 e temperatura de 30°C no intervalo de tempo de 10 minutos. Entretanto, para a manutenção da estabilidade desta enzima, as melhores condições são de pH 6,5 e temperatura de 25°C.

A estabilidade da enzima é maior no suco de caju quando comparada com o meio sintético, portanto o suco de caju pode ser utilizado industrialmente como substrato para esta enzima, pois a mesma apresenta boa estabilidade no fermentado bruto.

A síntese de oligossacarídeos prebióticos é favorecida utilizando-se concentrações de aceptores superiores à de sacarose e o aumento do grau de polimerização é obtido utilizando-se concentrações de sacarose e de aceptores próximas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F.; NAVES, R. V. **Caju, identidade tropical que exala saúde**. Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/cenargenda/divulgacao/sbef220106.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2006.

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

ANTUNES, A. E. C. **Influência do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de iogurtes naturais desnatados**. 2004. 219 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

AQUINO, D. S. **Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas da cana-de-açúcar**. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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

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

BELLO, J. **Os alimentos funcionais e nutracêuticos: nova gama de produtos na indústria alimentícia**. São Paulo, 1995.

BORGES, V. C. **Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos**. In: WAITZBERG, D. L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3. ed., v. 2. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 1495 - 1509.

BORNET, F.R. Undigestible sugars in food products. **Am. J. Clin. Nutr.**, Paris. v. 59, n. 37, p.63-69, 1994.

BORTOLOZO, E. Q.; QUADROS, M. E. R. Aplicação de inulina e sucralose em iogurte. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, p.37 - 47. 2007.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2002.

BURKERT, C. A. V. **Separação de glucose, fructose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas**. 2003. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CAVALCANTE, A. M. **Estado é líder na produção de caju no NE**. Economia. Jornal O Povo. Disponível em:<<http://www.opovo.com.br/opovo/economia/728118.html>>. Acesso em: 07 fev. 2008.

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

CHUNG, C. H.; DAY, D. F. Glucopoligosaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): a potential prebiotic. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 29, p. 196 - 199, 2002.

CHUNG, C.H.; DAY, D. F. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as poultry prebiotic. **Poultry Science**, v. 83, p. 1302 - 1306, April, 2004.

CORTEZI, M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Temperature effect on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolated from alcohol and sugar mill plant. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 279 - 285, 2005.

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

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

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

DOLS, M.; CHRAIBI, W.; SIMEON, M. R.; LINDELY, N. D.; MONSAN, P. F. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2159 - 2165, 1997.

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

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

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

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

GIBSON, G. R; FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 391 - 395, 2000.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr. Bethesda**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIRARD, E., & LEGOY, M. D. Activity of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F in presence of organic solvents. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 24, p. 425– 432, 1999.

GUIMARÃES, D. R. B.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hidrolisys by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 129 - 139, 1999.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005. ISSN 1415-5273.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 23, n.1, p.105 – 118, 2002.

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

HIDAKA, H. *et al.* Effects of frutooligosaccharids on intestinal flora and human health. *Bifidobacterium Microflora*, **Toio**, v.5, p.37-50, 1986.

HIGASHIMURA, Y.; EMURA, K.; KUZE, N.; SHIRAI, J.; KODA, T. **Fading inhibitors**. Canadian Patent 2378464, 2000.

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Produção de dextrana-sacarase utilizando substrato alternativos. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS – SINAFERM, v. 1, Recife. **Anais...** Recife: UFPE, 2005. p. 1 - 7.

HONORATO, T. L.; CHAGAS, C. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da fermentação de suco de caju para síntese de oligossacarídeos pré-bióticos. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA; III CONGRESSO BRASILEIRO DE TERMODINÂMICA APLICADA –CBTERMO. São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2006.

HONORATO, T. L.; RODRIGUES, S. Dextranucrase Stability in Cashew Apple Juice. **Food Bioprocess Technol.** DOI 10.1007/s11947-008-0053-2. Article in Press. 2008.

ILLANA, V.O.; MÚNGUÍA, A. L.; OLVERA, C. Molecular characterization of inulinase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 12, p. 3606 - 3612, 2003.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **J. Biosci.**, Bangalore, v. 27, p. 703-714, 2002.

LIMA, J. R. Caracterização físico-química e sensorial de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 32, n. 1, p. 191-195, jan./fev, 2008.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1 - 2, p. 1 - 17, 2001.

MACHIDA, Y.; FUKUI, F.; KOMOTO, T. **Use of oligosaccharides for promoting the proliferation of bidifidobacteria.** European Patent 0242459, 1986.

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.

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

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B. Volatile constituents of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal food composition and analysis**, New York, v. 13, p. 227 - 232. 2000.

MAKINO, Y. **Seleção de linhagens de Kluyveromyces produtoras de inulinase visando a obtenção de frutooligossacarídeos: caracterização na enzima e otimização das etapas de produção e purificação.** 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 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 : EMBRAPA/ CNPAT, 1995. 20 p.

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

MIYAKE, T.; MIKIHICO, Y.; KANO, T. **Imparting low-or anti-cariogenic property to orally usable products**. United States Patent 4518518, 1985.

MONCHOIS, V; WILLEMONT, R. M.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure function relationships. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 131 - 151, 1999.

MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 187 - 192, 1995.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; INNECCO, R. *et al.* Physical characteristics of cashew apples for fresh fruit market. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 537 - 540, 2001.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 587 - 597, 2007.

OLIVEIRA, V. H.; ANDRADE, A. P. S. **Produção integrada de caju. Abrindo portas para a qualidade**. Caderno de campo. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 2004.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385 - 390, 2003.

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

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOELIICKE, A. P. B. **Alimentos Funcionais**. São Paulo: Editora Varela, 2005. 100 p.

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

PLAYNE, M.J.; CRITTENDEN, R. Commercially Available Oligosaccharides. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 313, p. 10 - 22, 1996.

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

QUEIROZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. 118 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

RABELO, M. C.; RODRIGUES, S. ; PINTO, G. A. S. ; GONCALVES, L. R. B. . Síntese enzimática de adoçantes não cariogênicos. In: XXIV Encontro Universitário de Iniciação a Pesquisa, 2005, Fortaleza - CE. **Caderno de Resumos do XXIV Encontro Universitário de Iniciação a Pesquisa**, v. 1. p. 1-1, 2005.

RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Efeito da fonte de nitrogênio nas taxas de crescimento e produção de dextrana do *Leuconostoc mesenteroides* B742. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS – SINAIFERM, v. 1, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2007. p. 1-11.

RABELO, M. C.; HONORATO, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 31 - 40, 2006.

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p.105 - 110, 2002.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligosaccharides: a review comparison their physiological effects. **Cri. Rev. Food Sci. Nutr.**, Cambridge, Inglaterra, v. 33, n. 2, p. 103.108, 1993.

ROBYT, J.F. **Dextran**. In: MARK, H. F.; BIKALES, N. M.; OVERBERGER, C. G.; MENGES, G. (eds.) *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, v. 4, p. 752 - 767. New York: John Wiley & Sons, 1986.

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. 326 p.

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

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. Effect of phosphate on production of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 23, p. 57 - 62, 2003.

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 28, p. 9 - 14, 2005.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, p. 1-16, 2006.

SALGADO JM. Impacto dos alimentos funcionais para a saúde. **Nutr. Pauta**, v. 48, p. 10-17, 2001.

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.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 361 - 364, 2001.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1, p. 7-19, 1999.

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

SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos : uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 68/69, p. 41 - 50, 2000.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 983 - 990, set./out., 2003.

SILVA, S. V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

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

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.

SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V. H.; SCHMITT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v. 48, p. 85 - 89, 1994.

TORRES, E. A. F. S. **Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns**. 1 ed. São Paulo: Ponto Crítico, 2001. 160 p.

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.

YAMASHITA, K.; KAWAI, K.; ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, v. 4, p. 961 - 966, 1984.

ANEXOS

ANEXO 1 - Tabela de efeitos das variáveis independentes e resultados de análise de variância (ANOVA) referentes à produção de dextrana do planejamento experimental relacionado à otimização do meio de cultura para produção da enzima dextrana-sacarase.

a) Efeitos estimados para produção de dextrana

Dextrana		
Fator	Efeito	S.E.
Média	37.46*	8.09*
Extrato de Levedura (L)	-9.20	8.25
Extrato de Levedura (Q)	-9.63	11.10
Sulfato de Amônio (L)	5.71	8.25
Sulfato de Amônio (Q)	2.71	11.10
Extrato x Sulfato	-8.48	11.48

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

b) Resultados de análise de variância (ANOVA) referentes à produção de dextrana

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de <i>F</i>
Regressão	431,26	5	86,252	0,65
Residual	527,04	4	131,76	
Total	958,30	9		
Coeficiente de determinação				
<i>F</i> Tabelado (95%)				$F_{5,4} = 6,26$

ANEXO 2 - Tabela de efeitos das variáveis independentes e resultados de análise de variância (ANOVA) referentes a atividade enzimática do planejamento experimental relacionado à estabilidade da enzima dextrana-sacarase.

a) Efeitos estimados para a atividade enzimática em 3 horas

Atividade em 3 horas		
Fator	Efeito	S.E.
Média	7,21*	0,21*
pH	6,58*	0,48*
Temperatura	-1,89	0,48
pH x Temperatura	-4,02	0,48

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança

b) Resultados de análise de variância (ANOVA) referentes a atividade enzimática em 3 horas

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F
Regressão	63,04	3	21,01	91,35
Residual	0,23	1	0,23	
Total	63,27	4		
Coeficiente de determinação	1,00			
F Tabelado (95%)				$F_{3,1} = 215,71$