

Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato

Production of lactic acid and dextran using cashew apple juice as a substrate

Talita Lopes HONORATO¹, Maria Cristiane RABELO¹, Gustavo Adolfo Saavedra PINTO², Sueli RODRIGUES^{1*}

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar a utilização de excedentes agrícolas como substrato para produção de dextrana e ácido láctico. As fermentações foram conduzidas com o microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* B512F, em meio contendo suco de caju e sacarose. As concentrações de açúcar redutor e sacarose foram variadas de acordo com um planejamento experimental. No final da fermentação foram quantificados a dextrana, o ácido láctico e a biomassa produzida. Os resultados foram avaliados através da metodologia de análise de superfície de resposta. De acordo com os resultados obtidos, a elevação da concentração de açúcares favorece a produção de dextrana e de ácido láctico. A utilização do suco de caju como substrato alternativo para produção de dextrana e ácido láctico apresentou viabilidade técnica.

Palavras-chave: processos fermentativos; substratos alternativos; ácido láctico; suco de caju.

Abstract

The main aim of the present work was to study the use of agriculture excess as substrates for dextran and lactic acid production. The fermentations were carried out with the microorganism *Leuconostoc mesenteroides* B512F in a medium containing cashew apple juice and sucrose. The concentrations of reducing sugar and sucrose were varied according to factorial planning. At the end of the fermentation the dextran, the lactic acid and biomass produced were quantified. The results were analyzed by the surface response analysis methodology. According to the results increasing the sugar level favors dextran and lactic acid production. The use of cashew apple juice as an alternative substrate for dextran and lactic acid production presented technical viability.

Keywords: fermentation process; alternative substrates; lactic acid; cashew apple juice.

1 Introdução

Industrialmente a dextrana é produzida a partir da fermentação, em meio sintético, da bactéria láctica *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, que também produz ácido láctico durante a fermentação. A dextrana apresenta diversas aplicações que variam de acordo com sua massa molar.

A dextrana de alta massa molar pode ser empregada na indústria de petróleo; a de média massa molar é empregada na indústria de alimentos e a de baixa massa molar na indústria farmacêutica^{8,9}. A enzima dextrana-sacarase, responsável pela síntese de dextrana, é uma enzima extracelular obtida a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* B512F em meio contendo sacarose como fonte de carbono. A enzima promove a quebra da sacarose em unidades de glicose e frutose. As unidades de glicose são então polimerizadas formando a dextrana⁵. Segundo o mecanismo de inserção, o mais aceito atualmente para a síntese, a cadeia dextrana cresce ligada à enzima, sendo as unidades de glicose inseridas entre a cadeia polimérica e o sítio ativo³.

A utilização de substratos alternativos, em processos fermentativos, visa o aproveitamento de matérias-primas agrícolas de baixo custo. Esta prática diminui o custo do meio de cultura utilizado e, conseqüentemente, do produto final. Além de fonte de carbono e demais nutrientes, os substratos agrícolas apresentam composição complexa. Sua composição

total exata é muitas vezes desconhecida. Substratos agrícolas podem apresentar em sua composição elementos capazes de inibir o crescimento do microorganismo e/ou impedir a síntese do metabólito de interesse. Dessa forma, embora virtualmente qualquer substrato natural possa ser empregado como substrato para o cultivo de microorganismos, o estudo da viabilidade do emprego deste substrato é uma etapa necessária para assegurar sua utilização em larga escala.

O caju, largamente cultivado no Ceará, possui pedúnculo que é desperdiçado, pois o maior valor dessa cultura está associado à amêndoa da castanha. Embora o aproveitamento do pedúnculo apresente várias opções tecnológicas de industrialização, podendo ser aproveitado na elaboração de sucos, doces, refrigerantes, vinhos, polpas e outros produtos alimentícios, além do consumo in natura, o volume de pedúnculo produzido supera a quantidade processada.

Calcula-se que o país produza cerca de 1,5 milhão de toneladas de caju por ano. Considerando-se que o pseudo-fruto corresponde a 90% do peso do caju, menos de 10% desse total é aproveitado industrialmente ou para consumo in natura, sendo grande parte perdida no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento de castanha⁶.

Este substrato apresenta altos teores de glicose e frutose, que embora não sejam consumidos para a produção de dextrana, são metabolizados pelo microorganismo⁸. Além da produção de dextrana, a bactéria *L. mesenteroides* produz também ácido láctico, que juntamente com o ácido cítrico é um dos principais acidulantes utilizados na indústria de alimentos, encontrando também aplicações nas indústrias química e farmacêutica. A demanda pelo ácido láctico tem crescido recentemente devido ao crescimento da demanda por alimentos

Recebido para publicação em 27/3/2006

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001706)

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, CP 12168, Campus do Pici, Bloco 858, CEP 60021-970, Fortaleza - CE, Brasil, E-mail: sueli@ufc.br

² Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Sara Mesquita, 2270, Pici, CEP 60511-110, Fortaleza - CE, Brasil

*A quem a correspondência deve ser enviada

industrializados. No setor químico, o ácido láctico tem sido empregado para obtenção de plásticos biodegradáveis e para confecção de embalagens rígidas e flexíveis para acondicionamento de alimentos e outros produtos¹². O desenvolvimento do setor de embalagens biodegradáveis tem sido estimulado devido ao grande volume que os materiais plásticos ocupam nos aterros sanitários.

Neste trabalho, a produção de dextrana e de ácido láctico a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* B512F, bem como a viabilidade de crescimento do microorganismo, utilizando como substrato uma matéria-prima alternativa (suco de caju) foi estudada.

2 Material e métodos

2.1 Ativação do microrganismo

O microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* B512F foi obtido junto ao banco de microorganismos do Departamento Estadual de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agricultural, Peoria, Illinois, NRRL Culture Collection*).

A bactéria foi ativada em "shaker" rotatório a partir de meio sintético contendo somente sacarose como fonte de carbono. O meio utilizado para a ativação do microorganismo apresentava a seguinte composição: 50,0 g.L⁻¹ de sacarose; 20,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 20,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,20 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,01 g.L⁻¹ de MnSO₄.7H₂O; 0,01 g.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; 0,02 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 0,01 g.L⁻¹ de NaCl⁴. A ativação foi conduzida por 12 horas a 32 °C e agitação de 150 rpm. A biomassa assim obtida foi utilizada como inóculo nos ensaios fermentativos, onde foram inoculados 10% do volume do meio de cultura elaborado com o suco de caju.

2.2 Obtenção do suco

O suco de caju utilizado foi obtido junto à Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE), que forneceu o suco já clarificado, sendo o mesmo caracterizado inicialmente quanto ao pH inicial (potenciometria direta) e açúcares redutores totais⁷. A obtenção do suco a partir do pedúnculo, cultivado pela Embrapa no campo experimental de Pacajus – CE, foi realizada por prensagem mecânica. A clarificação do suco foi realizada através da adição de gelatina ao suco integral. A gelatina age como floculante de taninos e sólidos suspensos que interferem na fermentação, inibindo o crescimento microbiano. O suco foi, então, mantido em repouso por 12 horas em câmara fria (4 °C) para decantação dos flocos formados, obtendo-se assim o suco clarificado. O suco clarificado, por não conter conservantes, foi mantido congelado (-20 °C) até o momento de sua utilização. As etapas de processamento do pedúnculo para obtenção do suco integral, bem como sua clarificação foram realizadas na planta piloto da Embrapa Agroindústria Tropical.

2.3 Ensaios fermentativos

Os ensaios fermentativos para o estudo da viabilidade do crescimento do microorganismo, da produção de dextrana e de ácido láctico a partir da fermentação do *Leuconostoc*

mesenteroides B512F utilizando como substrato o suco de caju foram realizados em "shaker" rotatório a 32 °C. Este substrato foi adicionado à sacarose para induzir a produção da enzima, possibilitando a síntese de dextrana.

O processo fermentativo foi estudado através de um planejamento fatorial fracionário em dois níveis 2⁽⁵⁻²⁾¹, no qual foram variadas as concentrações iniciais de sacarose adicionada e açúcares redutores totais (através da diluição da matéria-prima), sendo considerados ensaios com ou sem a correção do meio no tocante à adição de íons metálicos, adição de fosfato (K₂HPO₄) e suplementação da fonte de nitrogênio (extrato de levedura), baseando-se nos valores do meio sintético⁴, conforme apresentado na Tabela 1. O pH inicial do meio de cultura de cada um dos ensaios foi ajustado para 6,7, que é o valor ótimo de pH para o crescimento do *L. mesenteroides*. Após o preparo, os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente, quando foram então inoculados com a cultura ativada em meio sintético, conforme descrito no item 2.1.

A fermentação foi conduzida por 24 horas e avaliada através da determinação da dextrana, do ácido láctico e do crescimento microbiano, o qual foi avaliado através da determinação da densidade ótica a 660 nm contra um branco do suco fermentado livre de células. As células foram removidas por centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos. O ácido láctico foi determinado por titulometria com NaOH padronizado. A dextrana foi removida através da precipitação com 3 volumes de etanol 96%^{10,11}, sendo determinada segundo o método fenol-sulfúrico para determinação de carboidratos totais². Todos os ensaios e análises foram realizados em duplicata. Os resultados foram analisados através de gráficos de superfície de resposta com o auxílio do *software* Statistica (Statsoft v. 5.0).

Tabela 1. Planejamento fatorial.

Ensaio	Sacarose	Açúcares redutores totais	Extrato de levedura	Fosfato	Soluções salinas* (%)
1	50,00	50,00	20,00	20,00	100
2	50,00	50,00	0,00	20,00	0
3	50,00	25,00	20,00	0,00	100
4	50,00	25,00	0,00	0,00	0
5	25,00	50,00	20,00	0,00	0
6	25,00	50,00	0,00	0,00	100
7	25,00	25,00	20,00	20,00	0
8	25,00	25,00	0,00	20,00	100
9	37,50	37,50	10,00	10,00	50

*soluções salinas em percentagem da concentração de referência (meio sintético apresentado no item ativação do microrganismo).

3 Resultados e discussões

A análise do suco fermentado demonstrou que houve crescimento celular, produção de dextrana e, portanto, produção da enzima dextrana-sacarase e de ácido láctico. Os resultados em termos de biomassa, dextrana e ácido láctico produzidos durante a fermentação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração de dextrana, oligossacarídeos e biomassa obtidos.

Ensaio	Dextrana	Ácido láctico	Biomassa (ABS 660 nm)	pH final
	g.L ⁻¹			
1	4,37 ± 0,04	20,75 ± 0,17	2,58 ± 0,04	4,02
2	2,76 ± 0,09	15,23 ± 0,10	2,15 ± 0,02	4,11
3	2,72 ± 0,10	11,81 ± 0,10	2,06 ± 0,01	3,79
4	1,51 ± 0,07	5,84 ± 0,17	1,52 ± 0,04	3,73
5	2,65 ± 0,06	10,57 ± 0,68	1,94 ± 0,01	3,89
6	1,49 ± 0,18	5,42 ± 0,75	1,66 ± 0,04	3,72
7	2,99 ± 0,18	15,27 ± 0,75	2,66 ± 0,04	4,20
8	1,56 ± 0,06	12,99 ± 0,69	2,47 ± 0,01	4,00
9	2,39 ± 0,09	12,57 ± 0,28	2,29 ± 0,15	3,83

De acordo com os resultados da Tabela 2, de forma geral, alguns valores de pH final são levemente inferiores aos observados para a fermentação em meio sintético, onde o valor mínimo observado é de 4,0^o. A maior formação de dextrana e de ácido láctico foi obtida para o ensaio 1, onde excetuando-se o teor de açúcar redutor, o meio apresenta composição idêntica ao sintético. Já os menores valores para dextrana e ácido láctico foram obtidos para o ensaio 6, onde não houve suplementação de fosfato ou de extrato de levedura, sendo menor também a concentração de sacarose. Em relação à biomassa, crescimentos mais elevados foram observados para os ensaios onde houve suplementação de fosfato e extrato de levedura (ensaio 1 e 7), seguidos daqueles onde houve suplementação do fosfato (ensaio 2 e 8). Os menores crescimentos de biomassa foram observados para os ensaios onde não houve suplementação de fosfato (ensaio 3 a 6).

Os efeitos de cada uma das variáveis nas repostas apresentadas na Tabela 2 são apresentados na Figura 1, onde o * denota que o efeito é estatisticamente significativo em um intervalo de 95 % de confiança.

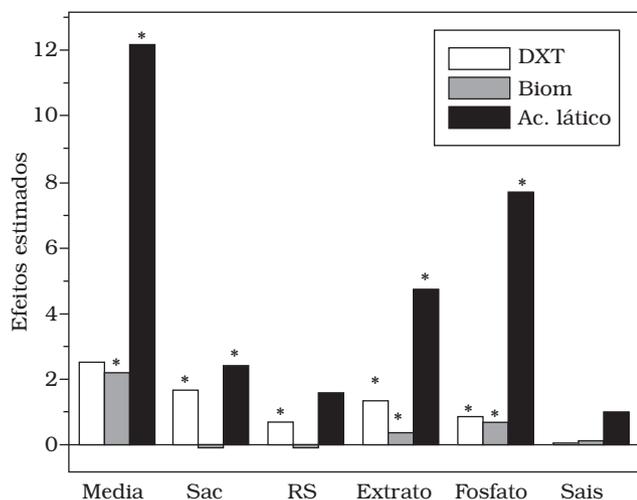


Figura 1. Efeito das variáveis estudadas na resposta do sistema. (DXT: dextrana; Biom: biomassa; Ac láctico: ácido láctico; Sac: sacarose; e RS: açúcar redutor).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 1, os maiores efeitos foram obtidos para a produção de ácido láctico. A adição íons metálicos (sais) não foi significativa no intervalo de confiança considerado (95 %), para nenhuma resposta do sistema. A sacarose só foi significativa para a produção de dextrana e ácido láctico. O açúcar redutor foi significativo somente para a produção de dextrana, enquanto que o fosfato e o extrato de levedura foram significativos para todas as respostas consideradas. Os gráficos de contorno obtidos para as variáveis mais significativas são apresentados nas Figuras de 2 a 6.

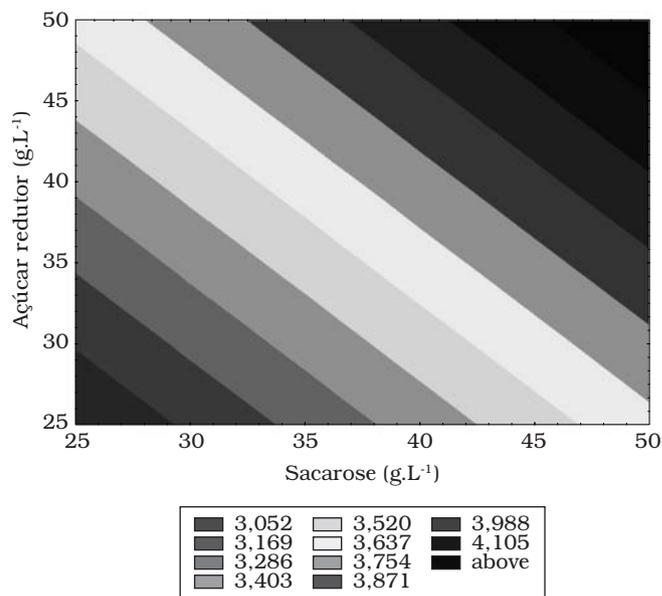


Figura 2. Produção de dextrana em função da sacarose e açúcar redutor.

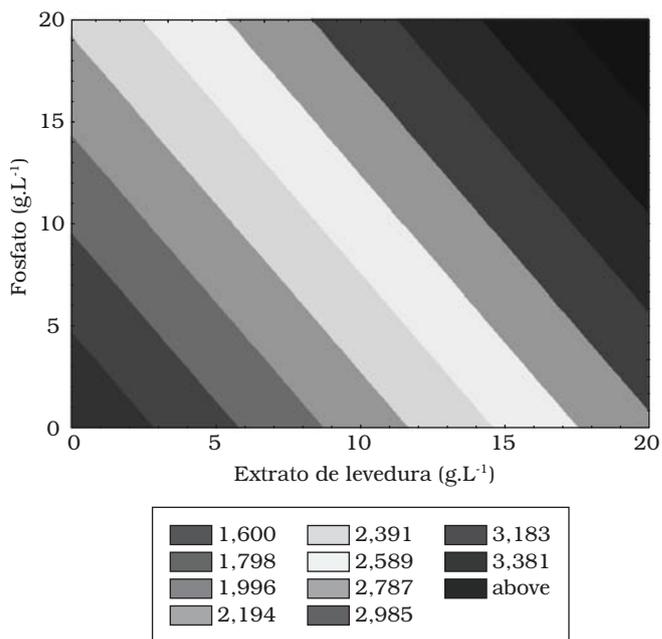


Figura 3. Produção de dextrana em função do fosfato e extrato de levedura.

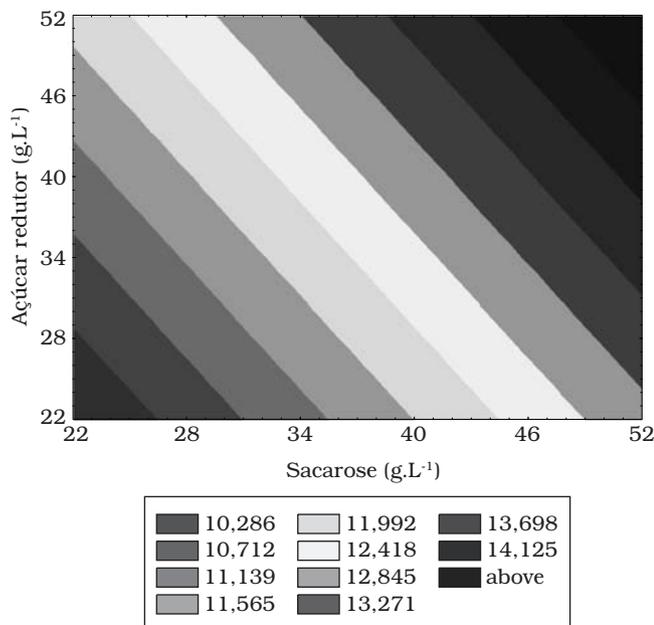


Figura 4. Produção de ácido láctico em função da sacarose e açúcar redutor.

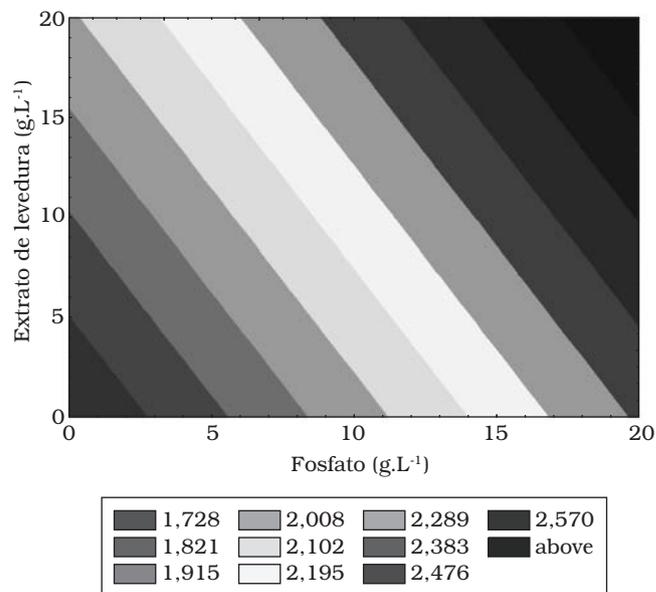


Figura 6. Biomassa obtida em função do fosfato e extrato de levedura.

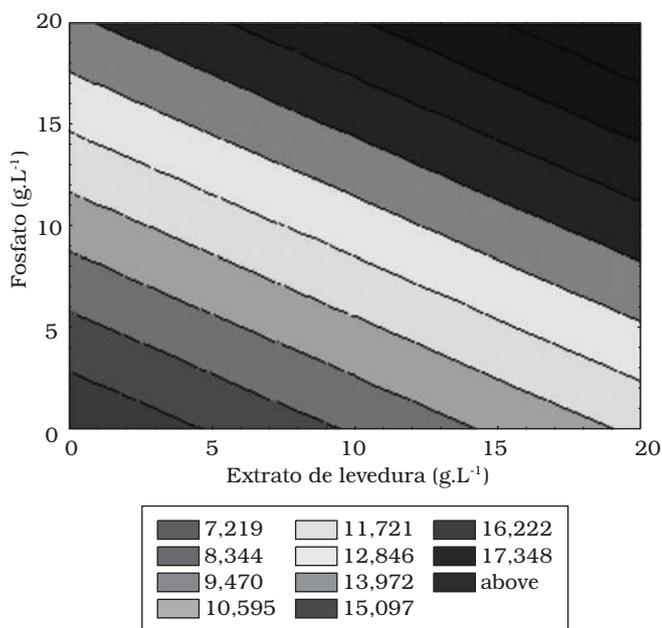


Figura 5. Produção de ácido láctico em função do fosfato e extrato de levedura.

De acordo com os gráficos de contorno apresentados nas Figuras 2 e 3, a síntese de dextrana é favorecida pelo aumento da concentração de sacarose e de açúcares redutores, bem como de fosfato e de extrato de levedura. A produção de ácido láctico é, também, favorecida pelo aumento da concentração de sacarose, de açúcar redutor, fosfato e extrato de levedura (Figuras 4 e 5). Entretanto, para o ácido láctico, o fosfato apresenta maior efeito que o extrato de levedura (Figura 5).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6, tanto o fosfato quanto o extrato influenciam a biomassa obtida, sendo que o aumento do fosfato apresenta maior efeito no crescimento da biomassa. A complementação de fosfato no meio de cultura formulado com o suco de caju favorece o crescimento do microorganismo, uma vez que este componente age tampando o meio e permitindo que a fermentação seja conduzida por mais tempo em valores de pH próximos ao valor ótimo de crescimento⁹. Um maior crescimento de biomassa leva a uma maior produção de dextrana e de ácido láctico (Tabela 1).

4 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a elevação da concentração de sacarose e açúcar redutor resulta em um aumento da produção de dextrana e de biomassa. A adição de fosfato age tampando o meio de cultura, favorecendo o crescimento da biomassa e da formação de dextrana e ácido láctico. A complementação da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) também favoreceu o crescimento da biomassa, da produção do ácido láctico e da dextrana, sugerindo que o teor de nitrogênio presente no suco de caju é baixo e sua suplementação é positiva.

Embora com menores rendimentos, houve crescimento microbiano, bem como formação de dextrana e de ácido láctico no meio de cultura formulado com o suco de caju e sem complementação da fonte de nitrogênio e fosfato (ensaios 4 e 6). A adição de solução salina não influenciou nenhuma das variáveis estudadas. Dessa forma, pode-se dizer que não há necessidade de adição de sais minerais ao suco de caju, sendo sua composição mineral natural suficiente para suprir as necessidades do microorganismo.

O uso de suco de caju para cultivo de *L. mesenteroides* é uma proposta inovadora, não tendo sido encontrada nenhuma referência sobre o assunto na literatura científica. Entretanto, segundo os resultados obtidos neste trabalho, a utilização do suco de caju clarificado para a produção de dextrana e ácido láctico a partir da fermentação do *L. mesenteroides* B 512 é viável, uma vez que ocorreu a produção de dextrana, de biomassa e de ácido láctico, mesmo sem complementação de fontes externas de nitrogênio e fosfato. O rendimento do processo pode ser melhorado através da otimização das condições de síntese (objeto de trabalhos futuros). A busca por fontes de nitrogênio complementares de baixo custo (resíduos e substratos agrícolas) também é necessária para o aumento do rendimento do processo.

A utilização do suco como meio de fermentação para produção de insumos de alto valor agregado é interessante, pois além de diminuir o custo da matéria-prima através do reaproveitamento de um produto que normalmente é desperdiçado, permite um melhor aproveitamento dos recursos agrícolas não utilizados, diminuindo com isso o impacto ambiental de sua disposição final.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pela bolsa concedida e à *NRRL Culture Collection* pela cepa de *L. mesenteroides* utilizada neste trabalho.

Referências bibliográficas

1. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 401 p.
2. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
3. EBERT, K. H.; SCHENK, G. Mechanism of biopolymer growth: the formation of dextrans and levan. **Adv. Enzymol.**, v. 30, p. 179-221, 1968.
4. GUIMARÃES, D. R. B. et al. Optimization of Dextran Synthesis and Acidic Hydrolysis by Surface Response Analysis. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 16, n. 2, p. 129-139, 1999.
5. HEINCKE, K. et al. Kinetics of the de dextransucrase acceptor with maltose: experimental results and modeling. **Enz. Microbial. Technol.**, v. 24, n. 8, p. 523-534, 1999.
6. LEITE, L. A. **A agroindústria do caju no Brasil: Políticas públicas e transformações econômicas**. 1. ed. Fortaleza: Embrapa/CNPAT, 1994. 195 p.
7. MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
8. 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 (UNICAMP), Campinas, SP, 2003.
9. RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. Effect of the phosphate concentration on the production of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 26, n. 1, p. 57-62, 2003.
10. RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 28, n. 1, p. 9-14, 2005.
11. RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. Study of dextran enzymatic synthesis using maltose as acceptor: yield and molecular weight. In: 16th INTERNATIONAL CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING AND PROCESS ENGINEERING, 16, 2004, Prague: **Proceedings...** CD-ROM p.1-9.
12. TSUJI, H.; FUKUI, I. Enhanced thermal stability of poly(lactide) in the melt by enantiomeric polymer blending. **Polymer**, v. 44, n. 10, p. 2891-2896, 2003.