

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂
ATMOSFÉRICO NA FERMENTAÇÃO DE FÉCULA DE MANDIOCA

LUIZ ERMINDO CAVALLET

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia - Área de Concentração em Energia
na Agricultura

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂
ATMOSFÉRICO NA FERMENTAÇÃO DE FÉCULA DE MANDIOCA**

LUIZ ERMINDO CAVALLET

Orientador: Prof^ª Dr^ª Marney Pascoli Cereda

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Energia na Agricultura

**BOTUCATU – SP
Dezembro – 2002**

Agradecimentos:

-À professora Marney P. Cereda pela orientação e oportunidade inestimável à capacitação docente ao ensino e pesquisa.

-À professora Sila M. Rodrigues e aos funcionários Jair e Lindamir do Departamento de Nutrição e aos professores Agnaldo Nascimento e Fábio Pedrosa do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

-A todos os técnicos do CERAT, em especial ao o Luiz, à Maria e à Aura.

-Ao professor Ducatti e ao funcionário Evandro do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais/UNESP/Botucatu.

-À professora Siu Mui Tsai, ao professor Paulo Cezar O. Trivelin e ao funcionário Wagner do CENA/USP pela colaboração técnica.

Ao professor Enílson Saccol de Sá e ao professor Rui Jardim Freire da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

-À Thereza pela assessoria em recursos de informática.

-A todos os meus colegas do Centro de Ciências Agrárias da UNIOESTE, em especial aos professores Armin Feiden e Antônio Carlos dos Santos Pessoa (*in memoriam*) pelo incentivo.

-Ao povo brasileiro que com seus impostos suporta o sistema público federal de bolsas de estudo e ensino gratuito.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	01
SUMMARY	03
1 INTRODUÇÃO.....	05
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	08
2.1 A cultura da mandioca.....	08
2.2 Fécula de mandioca.....	09
2.3 A fermentação natural de fécula de mandioca.....	10
2.4 Diversidade microbiológica na fermentação de fécula de mandioca	13
2.5 Fixação biológica de N ₂ na fermentação de outros amiláceos.....	16
2.6 Enzimologia do processo de fixação biológica de N ₂ atmosférico.....	16
2.7 O fracionamento isotópico ¹⁵ N/ ¹⁴ N pela atividade biológica.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Local de realização dos experimentos	21
3.2 Substratos da fermentação.....	21
3.3 Plano de experimento	22
3.4 Isolamento e desenvolvimento de inóculo	25
3.4.1 Inóculo misto.....	26
3.4.2 Inóculo selecionado.....	30
3.5 Experimentos de quantificação de nitrogênio.....	31
3.5.1 Primeiro experimento de balanço de nitrogênio – Experimento A.....	31
3.5.2 Segundo experimento de balanço de nitrogênio – Experimento B.....	32
3.5.3 Terceiro experimento de balanço de nitrogênio – Experimento C.....	33
3.5.4 Experimento com amostragem no líquido sobrenadante – Experimento D	34
3.5.5 Experimento com teste de inoculo – Experimento E.....	34
3.5.6 Experimento com amostragem no líquido sobrenadante e na fécula decantada – Experimento F.....	36
3.6 Verificação da presença do complexo enzimático da nitrogenase.....	37
3.7 Verificação da relação ¹⁵ N/ ¹⁴ N via espectrometria de massa	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Características físico-químicas das amostras de fécula.....	44
4.2 Desenvolvimento das fermentações.....	45
4.3 Balanço de nitrogênio no substrato de fécula de mandioca.....	46
4.4 Verificação da atividade enzimática da nitrogenase.....	55
4.5 Discriminação isotópica de ¹⁵ N pelo processo fermentativo.....	58
4.6 Resultados e forma de amostragem.....	61
4.7 Relação carbono/nitrogênio na fécula e no substrato da fermentação.....	62
4.8 Perdas de massa e procedimento de correção.....	63
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	66
6 CONCLUSÕES.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Comparação entre as composições físico-químicas de fécula e mandioca e polvilho azedo no Estado de Minas Gerais	11
2 Resumo dos experimentos de quantificação de nitrogênio.....	23
3 Características físico químicas das três amostras (I, II, III) de fécula de mandioca utilizadas nos experimentos	45
4. Valores de nitrogênio total ao longo do tempo no substrato de fécula de mandioca em dois experimentos, sendo experimento A conduzido em condições ambientais e experimento B conduzido na temperatura constante de 28°C.....	46
5. Teores de nitrogênio total no início (0), 24, 48 e 72 horas do processo de fermentação de fécula de mandioca (experimento C), com amostragem na suspensão com grânulos de fécula.....	47
6. Teores de nitrogênio total no início (0) e 48 horas (experimento D), com amostragem somente no líquido sobrenadante após três horas de repouso.....	48
7. Resultados em porcentagem de nitrogênio ao longo do tempo em fermentação de substrato de fécula de mandioca, com e sem inoculação.....	50
8. Teores de nitrogênio total no substrato de fermentação de fécula de mandioca no início (0), 48 e 72 horas após, no líquido sobrenadante e na fécula decantada com amostragem após três horas de repouso.....	53
9. Leitura em espectrometria de massa da discriminação do isótopo N ¹⁵ (δ ‰) e correspondente pico de voltagem do aparelho (pico1) em amostras (pico 2) coletadas em 24 e 72 horas após o início de processo fermentativo de fécula de mandioca e padrão de referência.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Fluxograma da produção do inóculo selecionado originado de meio isento de nitrogênio e repicado em placas de Petry e produção de inóculo misto a partir da seleção de unidades experimentais com maior porcentagem de nitrogênio	28
2. Frasco com volume de 1000 ml utilizado no experimento para verificação da presença do complexo enzimático nitrogenase na fase inicial do processo fermentativo de fécula de mandioca.....	40
3 pH e acidez no meio fermentativo de fécula de mandioca com e sem inoculação.....	51
4. Cromatogramas obtido em 48 horas após o início da fermentação em experimento com a amostra I de fécula de mandioca e com amostra III, sendo: 1- região de detecção do pico de etileno; 2 – pico do padrão de 500 ppm de etileno; 3 – pico de detecção de gás metano.....	56

RESUMO

O polvilho azedo apresenta evidências de aumento no conteúdo de nitrogênio total no substrato na primeira fase da fermentação natural. Tal incremento pode ser originado da fixação biológica de N_2 atmosférico através de bactérias de vida livre presentes no sistema fermentativo. Para investigar tal hipótese foram desenvolvidos experimentos em nível de laboratório, os quais foram fundamentados em quatro tipos de procedimentos metodológicos, sendo: (1) experimentos de quantificação de nitrogênio ao longo dos primeiros estádios da fermentação; (2) desenvolvimento de procedimentos de inoculação; (3) verificação de presença do complexo enzimático da nitrogenase via cromatografia gasosa e (4) verificação do fracionamento isotópico $^{15}N/^{14}N$ no substrato via espectrometria de massa.

O experimento constituiu na condução do processo fermentativo em escala de laboratório, utilizando-se três tipos de amostras de fécula de mandioca e água potável não clorada. Caracterizou-se, portanto, uma suspensão granular constituída de água sobrenadante e fécula decantada, o que determinou como principal problema o procedimento

de amostragem. Dessa forma os experimentos tiveram dois procedimentos de amostragem, quais foram: (a) na fase fécula ao fundo e no líquido sobrenadante após três horas da homogeneização do conteúdo total, ou (b) amostragem na suspensão com grânulos de fécula imediatamente após a homogeneização do conteúdo dessas.

Não foi detectado o complexo enzimático nitrogenase durante as primeiras 96 horas da fermentação de fécula de mandioca. Também não foi possível detectar alteração da relação isotópica N^{15}/N^{14} no substrato, pois, se esta ocorreu, foi muito baixa para que fosse detectada via espectrometria de massa. Após 48 e 72 horas do início da fermentação, houve um aumento do teor de nitrogênio na água sobrenadante ao mesmo tempo em que houve uma redução desse elemento na fécula decantada. Quando as amostragens foram feitas imediatamente após a homogeneização do substrato não foi possível detectar aumento da concentração de nitrogênio total. Porém, para esse mesmo tipo de experimento, a utilização de inóculo manteve os níveis de nitrogênio no substrato o que pode indicar a ocorrência do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico.

INVESTIGATION OF THE ATMOSPHERIC N₂ BIOLOGICAL FIXATION PROCESS IN CASSAVA STARCH FERMENTATION. Botucatu, 2002. 74p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LUIZ ERMINDO CAVALET

Adviser: MARNEY PASCOLI CEREDA

SUMMARY

The fermented cassava starch shows evidence of an increase of the total nitrogen content in the substrate. In the first step of the natural fermentation, such increase could be due to biological fixation of atmospheric N₂ by free-living bacteria present in the fermentative system. To verify this hypothesis laboratorial experiments were conducted based on four methodologies: (1) nitrogen quantification experiments during the first stages of fermentation; (2) development of inoculation procedures; (3) verification of the presence of the nitrogenase enzymatic complex by gas chromatography; (4) and verification, via mass spectrometry, of the ¹⁵N/¹⁴N isotopic fractioning in the substrate.

The experiment consisted of conducting the fermentative process in the laboratory using three types of cassava starch samples mixed with non-chlorinated drinking water. There was characterized a colloidal suspension with two phases, the upper one consisting of the supernatant water and the lower one the decanted starch, what determined the main problem for the sampling procedure. The samples, therefore, were obtained by two ways: collecting the lower starch phase and the supernatant phase three hours after homogenization,

and collecting the suspension immediately after homogenizing the experimental units. Three types of experimental units were used, varying according to the area of contact of atmospheric air with the supernatant water.

There were no evidences of the presence of the nitrogenase enzymatic complex during the first 96 hours of cassava starch fermentation. It was detected that the concentration of nitrogen (<0,1%) in the cassava flour and in the fermenting substrate was not sufficient for a mass spectrometry detection of the N^{15}/N^{14} isotopic relation. After 48 and 72 hours of the beginning of the fermentation there was a raise in the levels of nitrogen in the supernatant water, together with a decrease of nitrogen in the decanted starch. There was no increase in the total nitrogen level when the sampling was conducted immediately after the homogenization; however the use of inoculation maintained the nitrogen levels, which can indicate the presence of atmospheric N_2 biological fixation.

Keywords: nitrogen, cassava starch, fermentation.

1 INTRODUÇÃO

O polvilho azedo é um produto de qualidade variável obtido da fermentação natural de fécula de mandioca e secagem solar, levando em média 15 a 30 dias para ser produzido. O polvilho azedo é tipicamente produzido na América do Sul (Colômbia, Bolívia e Brasil). Ele também é largamente utilizado no setor alimentício para a fabricação de pães de queijo, biscoitos, roscas, brevidades, etc. A fermentação láctica natural que ocorre no extrato úmido da fécula de mandioca com posterior secagem ao sol é essencial para conferir ao polvilho azedo as suas específicas características funcionais, tal como a expansão durante o forneamento da massa.

Cereda (1975) isolou e identificou microorganismos da fermentação natural de fécula de mandioca e propôs sua ocorrência em três fases de duração variável. Na primeira desenvolveu-se uma microbiota pouco exigente composta em maioria por coliformes e aeróbios mesófilos. Na segunda fase desenvolveram-se microorganismos mais exigentes, identificados como produtores de ácidos orgânicos, muitos dos quais microaerófilos ou

anaeróbios. A terceira fase caracteriza-se pela presença de leveduras e microorganismos saprofíticos com produção de aromas.

A fécula de mandioca é uma importante fonte de carbono, que pode ser produzida de forma abundante e a baixo custo. A melhoria do teor protéico através do prolongamento do processo fermentativo e sua interação com o elemento nitrogênio podem abrir caminho para a obtenção de fonte de proteína com preço competitivo, quando comparado com os custos de produção da proteína animal e vegetal, ou mesmo a possibilidade de produzir proteína microbiana (SCP).

A principal evidência para a existência de uma origem externa de nitrogênio na fermentação seria a ocorrência de fermentação já vigorosa com 24 horas do início com relações carbono /nitrogênio ao redor de 730/1. Assim o nitrogênio necessário à formação da biomassa nos primeiros estádios da fermentação seria originário da atmosfera, já que o teor protéico disponível na fécula de mandioca é muito baixo. A hipótese adotada é da existência do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico no meio fermentativo natural de fécula de mandioca e para isso há a suposição de ligação daquele com qualquer incremento no balanço de nitrogênio. Em se tratando de processo biossintético é esperado que a presença de microrganismos esteja correlacionada com o aumento do conteúdo de nitrogênio.

As técnicas de seleção e inoculação de microrganismos, cromatografia gasosa, espectrometria de massa, bem como a determinação de teores totais do elemento nitrogênio têm sido instrumentos de sucesso na experimentação científica que tem atuado no processo de fixação biológica em outros sistemas estudados. Partindo-se do princípio que tal modelo teórico é válido quando aplicado ao ambiente da fermentação de

fécula de mandioca, estabeleceu-se como objetivo geral investigar em laboratório a fase inicial do processo de fermentação de fécula de mandioca através dessas técnicas e esclarecer a dinâmica e origem do nitrogênio nesse sistema.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot sculenta*, Crantz) é uma das mais antigas e tradicionais culturas do Brasil. Já era cultivada pelos índios na época do descobrimento em 1.500 e hoje é explorada em todo o território nacional e em vários países do mundo. É uma planta de fácil cultivo e requer pouca adubação e outros insumos. O regime de chuvas e o clima tropical e subtropical também favorecem a cultura na maior parte do território nacional. No mundo, a produção de mandioca em 1999 foi de 168 milhões de toneladas. O continente que mais produziu foi a África, com cerca de 54,81% e a maior produtividade pertenceu à Índia com 24 t/ha. A produção brasileira em 1999 de raiz de mandioca é de 21 milhões toneladas por ano. O maior Estado produtor é o Pará com participação de 16,87% da produção nacional em segundo foi o Estado do Paraná com cerca de 15,28%. O Estado de São Paulo, com a maior produtividade do país (21,4 t/ha), participou em 1999 com cerca de 2,8%. É um

dos produtos agrícolas que melhor adaptou-se nas regiões noroeste do Paraná, no sul do Mato Grosso do Sul e no oeste de São Paulo, principalmente em razão do solo arenoso e permeável destas regiões (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA, 1999).

2.2 Fécula de mandioca

A fécula de mandioca é chamada de polvilho doce, goma ou amido de mandioca é um produto amiláceo, obtido das raízes de mandioca e, de acordo com o teor de acidez, classificado como doce ou azedo (SÃO PAULO, 1978). É obtido em processo industrial, podendo apresentar rendimento de até 90% da fécula existente nas raízes. Sua forma é de um pó fino, seco, branco, inodoro, insípido e produz ligeira crepitação quando comprimido entre os dedos. A sua estrutura química de carboidrato é constituído de cadeias carbônicas lineares, no caso da amilose e cadeias carbônicas ramificadas, no caso da amilopectina. A fécula de mandioca é um produto extremamente versátil e alcança uma eficiência suficiente em todas as suas aplicações. É habitualmente utilizado como componente nos mais variados segmentos domésticos e industriais, ressaltando-se no setor alimentício e setor químico. Nesse, o produto também possui aplicação na química fina para obtenção de sorbitol, manitol e dextrose (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA, 1999).

A produção brasileira de fécula de mandioca atual é de aproximadamente 238 mil toneladas por ano, sendo que o estado do Paraná representa cerca de 70 % da produção nacional, equivalente a aproximadamente 167mil toneladas por ano. O preço

médio mensal de comercialização do amido de mandioca, por toneladas, expresso em dólares americanos no período de 1990 a 2000 foi de 341,4 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA, 1999).

2.3 A fermentação natural de fécula de mandioca

O polvilho azedo é o produto da fermentação natural de fécula de mandioca e posterior secagem solar. Ele leva em média de 15 a 30 dias para ser produzido, sendo que esse tempo varia conforme as condições climáticas do local de produção. O processo de produção industrial de polvilho azedo, bem como suas variações e peculiaridades são descritas por Cereda et al. (2001). A fermentação láctica natural que ocorre no extrato úmido da fécula de mandioca juntamente com a posterior secagem do mesmo mostrou ser essencial para conferir ao polvilho azedo as suas específicas características funcionais, tal como a expansão durante o forneamento da massa (WESTBY & CEREDA, 1994; ZAKHIA et al., 1996).

Apesar de seu baixo teor durante todo o processo fermentativo, o nitrogênio total para o processo fermentativo é, a princípio, originado da própria fécula de mandioca. A comparação da composição físico-química entre a fécula de mandioca e polvilho azedo, produzidos na mesma unidade industrial é apresentada na Tabela 1. Os resultados apresentados permitem calcular que os teores de proteína do polvilho azedo podem ser até 4 vezes maiores que os da fécula.

Cereda (1973) descreve a fermentação natural de fécula de mandioca sem inoculação e sem suplementações nutricionais. Nesse processo, o produto é suspenso em

água e já 24 horas após é visível a turvação da água sobrenadante e presença de bolhas na fécula decantada, que posteriormente sobem à superfície formando espuma. A fécula de mandioca é o único substrato empregado para esse crescimento, com cerca de 98% de amido na forma granular e cerca de 0,06% de nitrogênio total expresso em matéria seca (SARMENTO et al., 1994).

Tabela 1. Comparação entre as composições físico-químicas de fécula de mandioca e polvilho azedo no Estado de Minas Gerais.

Análises	Fécula de mandioca	Polvilho azedo
Umidade	16,22	15,62
pH	6,18	3,90
Acidez (*)	0,94	11,10
% na matéria seca		
Amido	98,11	95,54
% de nitrogênio total	0,06	0,24
Matéria graxa	0,22	0,25
Fibra	0,62	0,71
Cinzas	0,14	0,24

(*) expressa ml NaOH N/100 g de matéria seca (SARMENTO et al., 1994).

Na indústria, dentro do tanque, a fermentação da fécula de mandioca é feita sobre os grânulos do amido nativo em água, de forma natural, sem adição de nutrientes e sem pré-tratamento. Estudos mostram que a fermentação natural que origina o polvilho azedo ocorre principalmente devido à ação de bactérias do ácido lático. A temperatura não é fator limitante para o processo fermentativo natural da fécula de mandioca (CEREDA & LIMA, 1981), porém essa, juntamente com a duração e a composição da microflora, influenciam a propriedade de expansão do polvilho azedo produzido, o que torna o processo fermentativo algo fundamental na melhoria da qualidade do produto final (FIGUEROA et al., 1995).

Em se tratando de processo fermentativo é esperado que a presença de microrganismos aumente o conteúdo de nitrogênio. O que fica difícil de explicar é como uma fermentação, que já é vigorosa com 24 horas, consegue ter início com relações carbono/nitrogênio próximas de 730/1. Quando se compara a composição de fécula de mandioca e polvilho azedo, percebe-se que a fermentação pode enriquecer até 4 vezes o teor de nitrogênio total, o que é de grande importância tendo em vista a deficiência protéica dos produtos de mandioca (CEREDA & GIAV-LEVRA, 1987). Franco & Tavares (1998) também citam aumentos do teor de nitrogênio em polvilho azedo após a fermentação.

Cereda et al. (1984) analisaram a composição dos gases desprendidos em experimento de laboratório em recipientes fechados onde foi conduzido o processo de fermentação de fécula de mandioca. Revelaram a presença de hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, argônio e gás carbônico na atmosfera que fazia parte do sistema. No início, a composição percentual dos gases mostrou-se bastante próxima da composição do ar e o hidrogênio não chegou a ser detectado. A partir do início da fase visível da fermentação, isto é, quando começaram a aparecer bolhas de ar no substrato, ocorreu aumento gradativo no teor de hidrogênio e gás carbônico. O teor de argônio permaneceu praticamente constante e houve redução do teor de nitrogênio. Entre o 2º e 4º dias, correspondendo à produção intensa de gases, houve aumento de CO₂, consumo de nitrogênio e oxigênio. Admitiu-se, para explicar os resultados, que o N₂ da atmosfera no sistema fechado em fermentação foi consumido em certas fases, em detrimento da composição total, sendo o O₂ diluído pelo CO₂ produzido. Assim o nitrogênio necessário à formação da biomassa nos primeiros estágios da fermentação pode ter sido originado na atmosfera, já que o teor de nitrogênio total disponível na fécula é muito baixo.

2.4 Diversidade microbiológica na fermentação de fécula de mandioca

Cereda & Lima (1981) estudando a fermentação natural de fécula de mandioca, estabeleceram técnica laboratório que permitiu acompanhar o processo através de determinações de pH, acidez titulável, açúcares, ácidos orgânicos, além da enumeração, isolamento e identificação da microflora ocorrente. Os autores relataram que é difícil explicar uma fermentação tão exuberante a partir de um meio de cultivo tão pobre. No processo de purificação da fécula, perdem-se os solúveis de constituição da raiz, que apresenta, embora poucos, compostos nitrogenados e vitaminas. O substrato fica então restrito a uma suspensão de amido granular em água.

Entretanto Cereda (1975) identificou uma abundante microflora no material em fermentação, concluindo que na primeira fase desenvolve-se uma microflora pouco exigente, composta em sua maioria por coliformes e aeróbios mesófilos. Na segunda fase foram detectados microrganismos mais exigentes, identificados como produtores de ácidos orgânicos, muitos dos quais microaerófilos ou anaeróbios. A terceira fase caracterizou-se pela presença de leveduras e microrganismos saprófitos. Cereda (1973) em estudo sobre a fermentação da fécula de mandioca encontrou microrganismos pouco exigentes, produtores de ácidos que provocam a queda no pH do meio de 6,0 a valores em torno de 3,0, bactérias mais exigentes, caracterizadas pelos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* em fermentação láctica, *Propionibacterium* em fermentação propiônica e *Clostridium* em fermentação butírica e os saprófitos que utilizam os produtos metabólicos da fermentação. Destacaram-se as leveduras que conferem aroma e sabor ao polvilho azedo, além de bactérias do gênero *Bacillus*, sendo essas últimas também citadas por Carvalho (1994).

Ampe et al. (2001) apontam a não conveniência de métodos de cultivo para identificar e quantificar a diversidade microbiológica no meio fermentativo de fécula de mandioca. Por outro lado, avaliou tal ambiente com análise via técnica PCR-DGGE, que é um método via comparação de padrões de material genético extraído do ambiente, em 1, 6, 15 e 30 dias após o início da fermentação. Confirmou a dominância de bactérias do ácido láctico, e apontou principalmente espécies *Bifidobacterium minimum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* sp, *Enterococcus saccharolyticus* e *Lactobacillus plantarum*. Também encontrou *Lactobacillus panis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc citreum*. Utilizando técnica de hibridização de 16S rRNA, foi confirmada a presença de uma das mais recentes espécies de Lactobactérias, qual seja *Lactobacillus manihotivorans*. Essa espécie não foi detectada com as técnicas convencionais de identificação de microorganismos (AMPE, 2000; GUYOT et al., 1995). As espécies de *Lactobacillus* acima citadas foram confirmadas por Ben Omar et al. (2000), estudando diferentes tipos de fermentação de fécula de mandioca na Colômbia, sendo maioria as espécies *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Os pesquisadores têm dado mais atenção à segunda fase da fermentação da fécula de mandioca, onde os ácidos orgânicos são produzidos. A primeira fase não despertou igual interesse da pesquisa, embora represente um maior desafio científico. Segundo Cereda (1973) os microrganismos da primeira fase seriam os responsáveis pela rápida queda de concentração de O₂ dissolvido. Se a fonte de carbono é disponível e deve resultar da hidrólise do amido, restaria estabelecer a origem do nitrogênio.

A flora microbiana presente na fermentação natural da fécula de mandioca pode ser potencialmente responsável pelo processo de fixação biológica de N₂

atmosférico e ter participação na origem do nitrogênio no meio fermentativo. Diversos autores citam bactérias de vida livre como as do gênero *Bacillus* e *Clostridium* que são fixadoras de N₂ atmosférico de vida livre nos solos brasileiros (SELDIN et al., 1983; SANTOS & LACAVA, 1981) e que também são freqüentemente encontrados nas primeiras fases do processo de fermentação de fécula de mandioca (CEREDA et al., 1984). Estes mesmos autores, em ensaios de fermentação natural de fécula de mandioca utilizando sistemas de cultivo fechado e substrato esterilizado, observaram um consumo de nitrogênio contido na atmosfera do ensaio em certas fases, em detrimento da composição total. Tal constatação também apontou para a hipótese da ocorrência de microorganismos fixadores de nitrogênio atmosférico no processo de fermentação em estudo.

Cereda & Giav-levra (1987) em ensaios de laboratório com fermentação natural de fécula de mandioca confirmaram a presença de diferentes grupos de microorganismos não simbióticos fixadores de N₂ atmosférico, cada qual com atividade diferente ao longo dos primeiros oito dias do processo de fermentação natural de fécula de mandioca. Dentre eles os microorganismos formadores de gás foram os mais numerosos e os que primeiro apareceram, seguido pelos que causam turbidez no meio, sendo os formadores de película os menos freqüentes e últimos a aparecerem. Observaram também que o teor total de nitrogênio aumentou de 1,4 para 5,6% (p/v) no líquido sobrenadante.

O processo de inoculação tem sido utilizado para potencializar efeitos da diversidade microbiana presente no substrato de fermentação de fécula de mandioca. Através de procedimentos metodológicos específicos pode-se direcionar a atividade metabólica de determinados microorganismos, ou grupo de microorganismos, para desenvolver características desejáveis, como expansão, padronização do produto e diminuição do tempo de

fermentação, como foram observados por Cavallet et al. (2001). Da mesma forma, o processo de inoculação pode ser utilizado para potencializar o processo de fixação biológica de N_2 atmosférico que possa ocorrer no processo de fermentação de fécula de mandioca.

2.5 Fixação biológica de N_2 na fermentação de outros amiláceos

A ocorrência de fixação biológica de N_2 é relatada em processo fermentativo natural de outros alimentos amiláceos, como o Pozol, uma típica bebida utilizada no México obtida do amido de milho, onde os autores verificaram um aumento de N no substrato, bem como encontraram bactérias do gênero *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Chlostridium* que são fixadoras de nitrogênio e presentes no solo (ULLOA et al., 1971). Outro exemplo é com o processo fermentativo do “Tempeh” pelo *Rhizopus oligosporus* Saito, feito a partir de grãos de soja na Ásia, onde Hesseltine (1965) comenta um aumento considerável do nitrogênio solúvel, ainda que o nitrogênio total permanece quase inalterado.

2.6 Enzimologia do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico

A ocorrência do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico exige o complexo enzimático da nitrogenase, o qual é indispensável para o início do processo por catalisar a quebra da molécula de N_2 . Dessa forma, a detecção e quantificação desse complexo, mesmo que indireta, é tida como um procedimento metodológico para a investigação da existência do processo biológico de fixação de N_2 do ar.

O complexo da nitrogenase é formado por duas proteínas, sendo que a que contém o elemento ferro é chamada de componente II e a outra, que contém também molibdênio além de ferro, é chamada de componente I. A conformação do complexo nitrogenase varia quanto à espécie fixadora de N, sendo que, no caso de *Clostridium pasteurianum* a componente II é um dímero de duas sub-unidades idênticas formada por quatro átomos de ferro e quatro átomos de enxofre. Já a componente I é consideravelmente mais complexa, sendo uma molécula com quatro subunidades e contendo dois átomos de molibdênio, 30 átomos de ferro e muitos átomos de enxofre. Para que ocorra a fixação biológica de N₂ o componente II é reduzido por um ou ambos dos dois redutores de baixo potencial, quais sejam a ferredoxina ou flavodoxina, as quais são geradas durante o processo de fermentação de carboidrato ou na presença de uma alta relação NADPH/NADP⁺. Elétrons são transferidos da componente II para a componente I. Esta transferência é acoplada a hidrólise 4 ATP para cada par de elétrons. A componente I da nitrogenase por sua vez reduz o N₂ para amônia (NEVES & RUMJANECK, 1992).

A complexo da nitrogenase também pode reduzir acetileno a etileno, íon cianeto para metano e amônio, N₂O para N₂ e H₂O, e H⁺ para H₂. Uma de suas características mais peculiares é o fato de ser inativada em ambiente aeróbio. Isso para microorganismos anaeróbios estritos não é um problema em especial e enquanto para aqueles facultativos a fixação biológica dá-se apenas em ambiente aeróbio. Já para os microorganismos aeróbios estritos a fixação ocorre sob determinadas especificidades como no gênero *Azotobacter* onde o complexo enzimático é protegido por um ativo sistema de transporte de elétrons onde o oxigênio é removido do ambiente muito rapidamente. A inativação do

complexo enzimático da nitrogenase dá-se também pela presença de nitrito e nitrato bem como de amônio e ácidos orgânicos (LIMMER & DRAKE, 1998; HILL, 1992).

Com relação à possibilidade mecanismos metodológicos para determinar o complexo enzimático da nitrogenase, este tem a propriedade de reduzir o gás acetileno a etileno. Schollhorn & Burris (1967) e posteriormente Hardy et al. (1968) propuseram determinar a presença de gás etileno via cromatografia gasosa, como uma maneira indireta da existência do processo de fixação biológica de N₂ atmosférico em sistemas fechados onde o gás acetileno fosse introduzido. Esse procedimento vem sendo utilizado até os dias de hoje, com grande aplicação em fixação simbiótica de N₂ e mesmo para microorganismos assimbióticos (BODDEY, 1994).

2.7 O fracionamento isotópico ¹⁵N/¹⁴N pela atividade biológica

O elemento nitrogênio na sua forma isotópica 15, ou ¹⁵N, é muito utilizado como marcador em investigações sobre fixação biológica N₂ em plantas (YONEYAMA, 1996) devido à ocorrência de discriminação da forma ¹⁵N, também chamado de δ ‰ (delta por mil), pela ação preferencial de enzimas da atividade biológica. A massa de ¹⁵N discriminado pelo sítio ativo da enzima é mesurado via espectrometria de massa na relação 1:1000 da massa total (¹⁴N+¹⁵N).

Também pode ser adaptado para mesurar sistemas anaeróbios, como em experimento com *Anabaena cylindrica*. e *Rhodobacter capsulatus*, onde foram determinados o enriquecimento relativo do isótopo ¹⁵N na síntese de pigmentos fotossintético. O enriquecimento relativo foi observado no pigmento formado e os autores explicam isso

como a discriminação da forma isotópica ^{15}N pela enzima glutamato sintetase quando da via metabólica de glutamato. Há uma tendência da enzima em dar preferência para o isótopo ^{14}N , que é mais leve, deixando o ^{15}N no ambiente do substrato (BEAUMONT et al., 2000; VALADI et al., 2001).

O ambiente onde ocorre o processo fermentativo de fécula de mandioca é anaeróbio, semelhante ao ambiente aquático onde ocorre o processo de fixação de nitrogênio pelas espécies de bactérias citadas acima. Dessa forma pode-se tomar como referência esse ambiente e adaptá-lo a aquele onde ocorre o processo fermentativo do polvilho doce e medir o fracionamento isotópico ao longo da fermentação. Para ocorrer o processo de fixação biológica de N_2 atmosférico nesse meio, necessariamente ocorrerá o fracionamento isotópico de ^{15}N uma vez que a via do glutamato é imprescindível na formação de compostos nitrogenados da célula bacteriana. Dessa forma, mesurando-se a relação isotópica $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, via espectrometria de massa antes e depois da fermentação pode-se ter um indicativo da existência da ocorrência do processo biológico, pois os compostos nitrogenados formados após um determinado tempo de fermentação terão um enriquecimento relativo do isótopo ^{15}N , característico devido à ação de enzimas da via glutamato e seus desdobramentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental foi fundamentada em quatro tipos de procedimentos metodológicos utilizados para obtenção de resultados durante a fase inicial do processo de fermentação de fécula de mandioca, quais foram: experimentos de quantificação de nitrogênio total no substrato, desenvolvimento e aplicação de inóculo obtido pela seleção do meio fermentativo de microorganismos potencialmente capazes de incrementar o nitrogênio, verificação indireta via cromatografia gasosa da presença do complexo enzimático da nitrogenase pela redução de acetileno a etileno, e verificação via espectrometria de massa da atividade biológica no meio fermentativo pela variação da relação isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Os procedimentos metodológicos acima foram desenvolvidos considerando a hipótese de que se pode conseguir uma fermentação típica de fécula de mandioca em laboratório e nessa fosse possível detectar um aumento do conteúdo de nitrogênio total no meio, bem como evidências da atividade biológica responsável por tal aumento.

3.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de quantificação de nitrogênio e desenvolvimento de inóculo foram realizados em laboratórios do CERAT (Centro de Raízes e Amidos Tropicais) localizado na Fazenda Experimental Lageado da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu (SP) e no Laboratório de Pesquisa do curso de Nutrição da Universidade Federal do Paraná (UFPR), na cidade de Curitiba (PR). O experimento de leitura da relação isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ em espectrometria de massa foi feito no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, junto ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu (SP). O experimento com cromatografia gasosa para a verificação do complexo enzimático da nitrogenase, foi desenvolvido no CENA/USP, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, junto ao Campus da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, na cidade de Piracicaba (SP).

3.2 Substratos da fermentação

Utilizando-se o processo fermentativo natural de fécula de mandioca em sua fase inicial como base para a realização dos ensaios, foram definidos a princípio os substratos da fermentação, quais sejam: três amostras de fécula de mandioca e água, utilizados conjuntamente. A amostra I foi obtida a partir de 10 kg de raízes da cultivar Branca de Santa Catarina, com 12 meses de idade e colhidas no setor de recepção de uma indústria de polvilho azedo da cidade de Marechal Cândido Rondon (PR) e a extração, separação e secagem da fécula de mandioca foi feita artesanalmente, sendo que a secagem foi feita aproximadamente

uma hora após a extração, durante 24 horas em ambiente aberto em bandeja de alumínio e com jato de ar de aproximadamente 70°C sendo direcionado de baixo para cima e sem entrar em contacto com a amostra de fécula. Para adicionar às unidades experimentais formadas com a amostra I, foi utilizada água potável não clorada. A amostra II foi obtida a partir de 20 kg de raízes da mesma variedade do experimento anterior, porém com 15 meses de idade e colhidas no Setor de Horticultura da FCA UNESP / Botucatu e extraída e secada na planta piloto de extração de amido do Centro de Raízes e Amidos Tropicais - CERAT, com capacidade de 0,5 t/h de matéria prima. A água utilizada juntamente com a amostra II teve a mesma origem daquela utilizada nos experimentos conduzidos com a amostra I. A amostra III foi obtida de fécula comercial tipo 2, marca “Molinari”, produzida na cidade de Indaial (SC), em uma embalagem de 500 g. A água utilizada na formação das unidades experimentais era potável, não tratada, porém de origem diferente daquelas utilizadas para as amostras I e II.

Na caracterização físico-química das amostras de fécula de mandioca utilizados na condução dos experimentos, as análises de amido foram feitas segundo Rickard & Behn (1987) e demais parâmetros seguiram metodologia segundo Instituto Adolfo Lutz (1985). A leitura de pH foi feita com potenciômetro marca MS Tecnon, modelo PA200. A relação C/N foi calculada teoricamente por estequiometria considerando haver uma 44,44% de carbono em uma molécula de amido.

3.3 Plano de experimento

Um resumo com a definição das características principais dos experimentos de quantificação de nitrogênio é apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos experimentos de quantificação de nitrogênio

Experi- mento	tempe- ratura °C	tipo de fécula e quantidade	água (mL)	quantidade de inóculo ¹	volume total (mL)	quantidade e tipo de amostragem
A	8-25	I, 8,000 g	20	0,2 mL _{EFI}	Tubos 24	suspensão 5 ml
B	28	I, 10,000 g	15	0,2 mL de A	Tubos 24	suspensão 5 ml
C	28	I, 8,000 g	15	0,2 mL de B	Tubos 24	suspensão 5 g
D	28	I, 6,000 g	15	0,2 mL de C	Frascos 29	sobrenadante 5 g
E	28	II, 8,000 g	15	1 mL _{IS} +1 mL _{IM}	Frascos 29	suspensão 5 g
E	28	II, 8,000 g	17	nenhum	Frascos 29	suspensão 5 g
F	28	III, 6,000 g	15	nenhum	Frascos 29	decantado 5 g
F	28	III, 6,000 g	15	nenhum	Frascos 29	sobrenadante 5 g

¹IM=Inóculo Misto; IS=Inóculo Seleccionado; EFI=Ensaio Fermentação Inicial

Quando do planejamento do experimento com um todo, a principal questão foi estabelecer um procedimento de amostragem que estivesse de acordo com o objetivo geral do mesmo. O substrato a ser amostrado é uma suspensão, por isso a amostragem foi estabelecida de duas formas: (a) amostragem imediata e a uma mesma profundidade após a homogeneização do conteúdo total a ser amostrado, para conter uma amostra representativa das duas fases que constituíam a suspensão, quais sejam água e fécula; (b) amostragem após um período de 3 horas na fécula de mandioca decantada e outra na água sobrenadante.

Considerando a hipótese de existir o processo de fixação biológica de N₂ atmosférico, teve-se a preocupação de variar a superfície de interface entre o conteúdo do frasco e a fase gasosa imediatamente acima. Dessa forma trabalhou-se com dois tipos de recipientes para o experimento de quantificação de nitrogênio, quais sejam tubos de ensaio e frascos de plástico com diâmetro de 16 x 30 mm respectivamente. Para o experimento de verificação da relação isotópica ¹⁵N/¹⁴N utilizou-se apenas os frascos de plásticos por conterem a maior superfície de contato com o ar e para o experimento de verificação do complexo

enzimático da nitrogenase foi utilizado esses frascos e também um outro com diâmetro de 100 mm.

Apesar da fermentação de fécula de mandioca ser de ocorrência natural, optou-se por desenvolver e testar um inóculo, o qual fosse potencialmente capazes de otimizar o parâmetro básico de verificação do objetivo geral do experimento, qual seja, promover um aumento do teor do elemento nitrogênio no substrato em estudo.

Também a relação das quantidades de fécula/água/inóculo na montagem das unidades experimentais foi variada uma vez que se supunha estarem diretamente relacionadas com a relação carbono/nitrogênio, a qual tem influência no desenvolvimento do processo fermentativo. Dessa forma, foram utilizadas, segundo cada experimento, $6,000\pm 1$, $8,000\pm 1$, $10,000\pm 1$ ou 200,0 gramas de fécula das três amostras descritas anteriormente. Da mesma maneira, segundo cada experimento, foram adicionadas nos recipientes, 10,0, 15,0 ou 200,0 mL de água e quantidades de inóculo variando de 0,2, 1,0 ou 20 mL. Dessa forma, a quantidade de inóculo adicionado ao meio foi sempre em torno de 10% do volume total deste.

À exceção do experimento A, conduzido à temperatura ambiente, todos os experimentos foram conduzidos em banho-maria ou em estufa bacteriológica e a temperatura de incubação foi fixada em de 28°C , uma vez que, em ensaios prévios sobre fermentação de fécula de mandioca, Cereda (1973) e Cereda & Lima (1981), constataram que a temperatura não é fator limitante para o processo.

Assim, o plano do experimento foram desenvolvidos seis experimentos (experimentos A, B, C, D, E e F) os quais variaram determinadas condições e tiveram o objetivo de detectar possíveis variações no teor de nitrogênio total no substrato de fermentação ao longo dos primeiros dias do processo. Paralelamente a esses experimentos e utilizando

indicações de unidades experimentais que contivessem o maior conteúdo de nitrogênio total, foi selecionado um inóculo, o qual foi sucessivamente enriquecido e reinoculado na seqüência de experimentos. Ao final, obteve-se um inóculo misto composto a partir do enriquecimento de potenciais microorganismos fixadores de nitrogênio atmosférico ao longo dos experimentos de quantificação de nitrogênio total e composto da seleção de cultura bacteriana obtidas do meio fermentativo da fécula de mandioca e desenvolvidas através de meio de cultura isento de nitrogênio. De todos os experimentos de quantificação de nitrogênio total, apenas o experimento F não teve sido inoculado e o processo fermentativo nesse, portanto, ocorreu de forma natural.

Com a utilização do inóculo desenvolvido previamente e representado na Figura 1, foi conduzido um experimento, onde foi utilizado cromatografia gasosa para verificar a atividade do complexo enzimático da nitrogenase no substrato de fécula de mandioca. Também foi desenvolvido um experimento para investigar a discriminação isotópica de ^{15}N , sendo que para isso foi utilizado o princípio da espectrometria de massa.

3.4 Isolamento e desenvolvimento de inóculo

A Figura 1 mostra o fluxograma do desenvolvimento do Inóculo Misto e Inóculo Selecionado, os quais foram concomitantemente desenvolvidos e testados ao longo dos cinco primeiros experimentos de balanço de nitrogênio (experimentos A, B, C, D e E) e também nos primeiro experimentos de verificação da presença do complexo enzimático da nitrogenase e discriminação isotópica de ^{15}N .

O desenvolvimento dos inóculos tiveram como um dos procedimentos básicos a tentativa de seleção de microorganismos potencialmente fixadores de nitrogênio atmosférico. No caso do Inóculo Misto e do Inóculo Selecionado foi feita a seleção ao longo dos experimentos das unidades experimentais as quais contivessem a maior porcentagem de nitrogênio e posterior repicagem da água sobrenadante dessas nas unidades do experimento seguinte e assim sucessivamente, sendo isso uma adaptação do método desenvolvido por Cereda (1973). Dessa forma, ao selecionar-se o frasco ou tubo de ensaio com a maior concentração de nitrogênio dentro de um experimento de balanço de nitrogênio, selecionou-se cepas de microorganismos potencialmente capazes de aumentar o conteúdo de nitrogênio no substrato em estudo. Esse tipo de inóculo, desenvolvido pela seleção de unidades experimentais, as quais contivessem o maior teor de nitrogênio caracterizou o denominado Inóculo Misto. Outro procedimento utilizado para o desenvolvimento de um inóculo capaz de aumentar o teor de nitrogênio total no substrato de fermentação foi o isolamento de microorganismos obtidos através de meio seletivo isento de nitrogênio. Esse procedimento caracterizou a obtenção do Inóculo Selecionado.

3.4.1 Inóculo Misto

Na Figura 1, em seu lado direito, é apresentado a seqüência de desenvolvimento do Inóculo Misto, sendo que os experimentos de quantificação de nitrogênio que fazem parte dessa seqüência são apresentados no item 3.5. O ensaio de fermentação, o qual deu início ao preparo do Inóculo Misto, foi consumado quando da coleta da água sobrenadante em 48 horas após a mistura de 300 g de polvilho fécula de mandioca da amostra I, juntamente com 500 mL de água

em um copo Erlenmayer de 1000 mL. A água sobrenadante coletada foi transferida em volume de 50 mL para copo Becker de 200 mL e com auxílio de pipeta graduada de 1,0 mL foram colocados 0,2 mL dessa em cada uma das 32 unidades experimentais do experimento A antes da introdução de fécula de mandioca e da água nesses. Após a determinação da quantidade de nitrogênio total em cada unidade do experimento A, as unidades foram guardadas sob refrigeração a 5°C e ao final do experimento escolheu-se aquela que apresentou a maior quantidade de nitrogênio. Dessa, a qual foi mantida sob refrigeração por cinco dias, foi retirado 10 mL e passado em copo Becker e inoculado 0,2 mL em cada uma das 24 unidades do experimento B. Da mesma forma, nesse experimento foi selecionado o tubo de ensaio com a maior concentração de nitrogênio guardada sob refrigeração a 5°C.

Do tubo de ensaio que conteve a maior concentração de nitrogênio do experimento B, foram coletados 5 mL e destes foram introduzidos 0,2 mL em cada um de outros quatro tubos de ensaios (19x20 mm) com $8,000 \pm 1$ g de fécula de mandioca da amostra I, juntamente com 15 mL de água, e incubados há 48 horas à temperatura de 28°C. Após esse período todos os tubos foram ajustados ao seu peso inicial com água destilada e auxílio de uma pipeta de 0,1 mL, e determinou-se individualmente a porcentagem de nitrogênio. Após cinco dias sob refrigeração, retirou-se a água sobrenadante do tubo de ensaio que apresentou a maior concentração de nitrogênio e foram introduzidos 0,2 mL em cada uma das 16 unidades experimentais do experimento C.

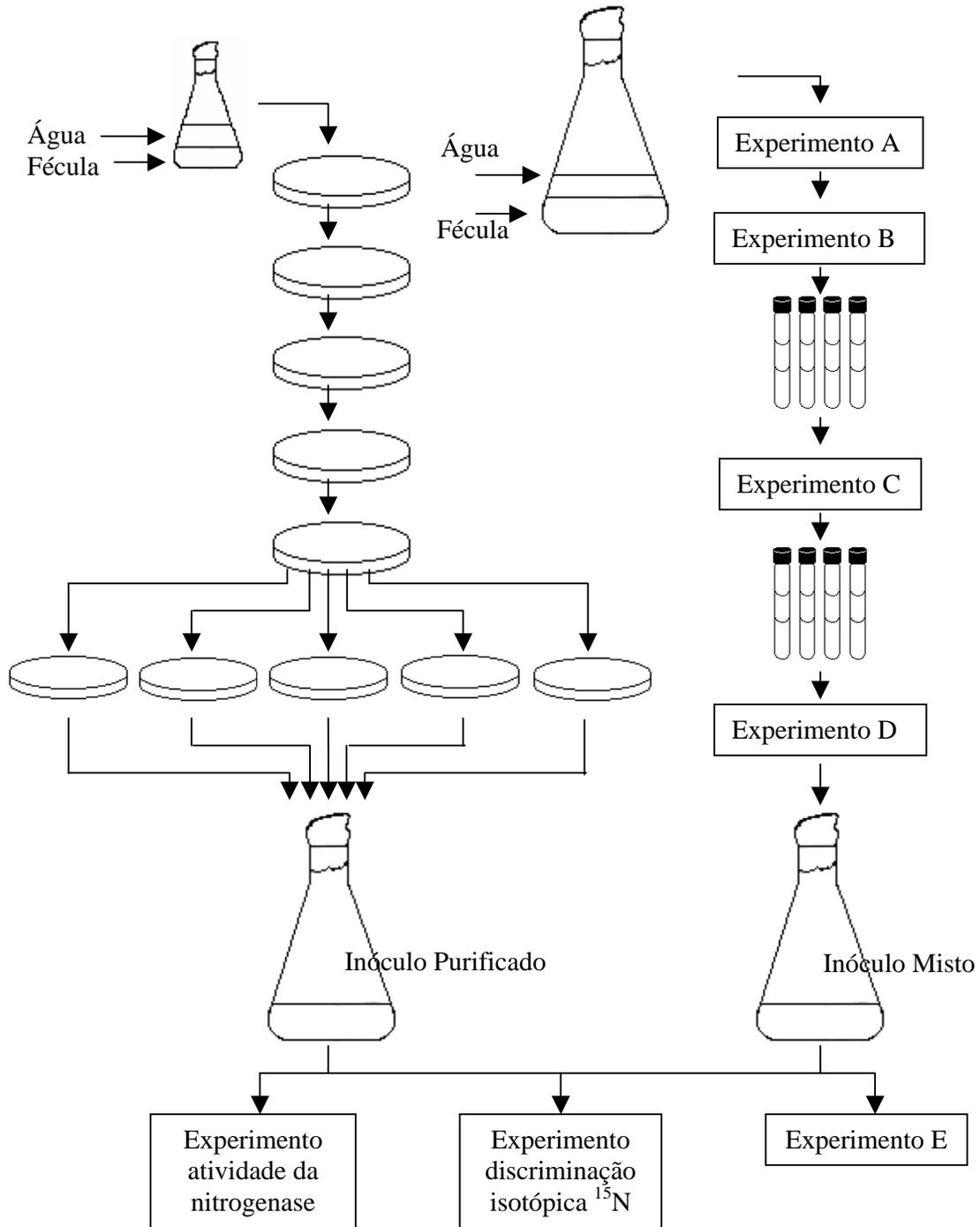


Figura 1. Fluxograma dos experimentos com uso de Inóculo Seleccionado originado de meio isento de nitrogênio e repicado em placas de Petry, e Inóculo Misto a partir de seleção de unidades experimentais com maior porcentagem de nitrogênio

Após determinação do conteúdo de nitrogênio do experimento C, novamente foi selecionado o tubo com a maior concentração de nitrogênio e inoculados 0,20 mL em quatro tubos da mesma forma descrita anteriormente. Após 24 horas determinou-se a concentração de nitrogênio nos quatro tubos e selecionou-se aquele que teve o maior teor que foi guardado sob refrigeração de 5°C e retirou-se da refrigeração 0,5 mL de sua água sobrenadante foi introduzida em cada uma das 14 unidades experimentais do experimento D.

Após 48 horas foram selecionadas as quatro unidades experimentais que obtiveram a maior concentração de nitrogênio e suas águas sobrenadantes foram misturadas, totalizando 28 mL que foram adicionadas a mais 30 mL de água destilada e esterilizada. Essa foi a forma final do inóculo misto, a qual totalizou aproximadamente 60 mL e foi misturada com volume igual Inóculo Selecionado, descrito no item 3.4.2, sendo que essa mistura foi mantida sob refrigeração a 5°C até a implantação do experimento E onde a mesma foi testada com inoculação de 1,0 mL em cada frasco.

Após o experimento E, foram selecionadas as quatro unidades experimentais que apresentaram a maior concentração de nitrogênio e suas águas sobrenadantes, foram misturadas em copo Erlenmayer de 200 mL, juntamente com 100 mL de água destilada e esterilizada, totalizando 120 mL ao todo, o qual foi mantido sob refrigeração a 5°C e serviu de inóculo para os experimentos de verificação da atividade enzimática da nitrogenase e para o experimento com espectrometria de massa para a verificação da relação isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Observa-se, portanto, que a forma do inóculo testado ao final foi representado por partes iguais do Inóculo Misto e do Inóculo Selecionado.

3.4.2 Inóculo Selecionado

A Figura 1, em seu lado esquerdo mostra a seqüência de obtenção do Inóculo Selecionado, o qual foi obtido com crescimento de suspensão em meio seletivo isento de nitrogênio. Foi estabelecido o seguinte procedimento: para o ensaio de fermentação foram colocados 70 ± 5 mL de caldo nutritivo isento de nitrogênio em 2 copos Erlenmayer de 100 mL e posteriormente autoclavado por 30 minutos. Nesse recipiente e em ambiente estéril, foram inoculados 0,5 mL de água sobrenadante coletada em 24, 48 e 72 horas após início da fermentação de fécula de mandioca, conduzido à temperatura de 28°C . Os dois copos Erlenmayer, inoculados, foram incubados a 28°C em estufa bacteriológica. Após 24 horas, quando já era visível a turvação de crescimento, foi pipetado 1 mL desta suspensão que foi inoculado em ambiente estéril em uma placa de Petry, previamente preparada com 10,0 mL de meio de cultura isento de nitrogênio e esterilizado.

O meio de cultura usado para crescimento e seleção de microorganismos fixadores de nitrogênio teve a seguinte formulação: caldo sacarose/sais minerais: 10g sacarose, 3g CaCO_3 , 900 mL H_2O destilada e 100 mL de solução de sais minerais, formulada com 5g K_2HPO_4 ; 2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1g de CaCO_3 ; 0,2g de FeSO_4 ; 0,2g de MnSO_4 ; 0,1g de $\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,1g de KI, sendo o volume completado a 1000mL com água destilada. O mesmo meio foi acrescentado de 20 g de agar (LARPENT & LARPENT GOURGAUD, 1975; SANTOS & LACAVA, 1981). Este meio foi elaborado a partir da mesma formulação de caldo nutritivo, porém com adição de agar. As placas foram incubadas a 28°C e após 48 horas, quando do crescimento microbiano visível, foi repicado novamente em outra placa de Petry sob as mesmas condições e assim sucessivamente mais quatro vezes, sempre em

48 horas após a repicagem. A última repicagem foi feita em cinco placas de Petry com o mesmo meio de cultura. Foram colocados 10,0 mL de água estéril na superfície de cada uma das cinco placas de Petry e, em ambiente estéril, fez-se uma homogeneização com o crescimento microbiano. As suspensões formadas em cada uma das cinco pelas cinco placas de Petry foram reunidas em copo Erlenmayer de 200 mL, totalizando ao final aproximadamente 100 mL de inóculo, volume esse que foi guardado sob refrigeração a 5°C e misturado com o Inóculo Misto, obtido no item 3.4.1.

3.5 Experimentos de quantificação de nitrogênio

Os experimentos de quantificação de nitrogênio totalizaram seis experimentos (experimentos A, B, C, D, E e F) e todos eles tiveram objetivo de detectar variações no balanço de nitrogênio na fase inicial do processo fermentação de fécula de mandioca, levando em consideração variações como a forma de amostragem, efeito de inoculação, tipo de unidade experimental e relação fécula/água.

A quantificação de nitrogênio, no que concerne ao procedimento metodológico de extração, destilação e titulação das amostras foi feito conforme metodologia da AOAC (1998).

3.5.1 Primeiro experimento de balanço de nitrogênio – Experimento A

O primeiro experimento, ou experimento A, foi conduzido em ambiente sem controle de temperatura e que variou de 8 a 25 °C. Foi colocado 8,000±1 g de fécula de

mandioca da amostra I em tubo de ensaios de 16 x 150 mm, com tampa, juntamente com 20 mL de água e 0,2 mL de inóculo do ensaio de inicial de fermentação descrito no item 3.4.1. Determinou-se a percentagem de nitrogênio total no início (0 horas), 24, 48, 72, 96 e 120 horas, sendo que para cada determinação foram feitas 4 vezes, totalizando 32 tubos de ensaio. Antes da coleta de amostra, o peso de cada tubo de ensaio foi ajustado àquele que possuía no início do experimento. A percentagem de nitrogênio foi feita em 5,0 mL de amostra colhida com pipeta de vidro a 3,0 cm abaixo do nível da suspensão e imediatamente após a homogeneização dessa. A coleta de amostra, portanto, foi obtida volumetricamente e havia grânulos de amido na suspensão.

3.5.2 Segundo experimento de balanço de nitrogênio – Experimento B

O segundo experimento, ou experimento B, foi conduzido sob temperatura constante de 28°C, em banho-maria. Colocou-se 10,000±1 g de fécula de mandioca da amostra I em tubo de ensaios de 16 x 150 mm, juntamente com 15 mL de água e 0,2 mL de inóculo proveniente do tubo de ensaio do experimento A, selecionado pela maior percentagem de nitrogênio. Com o auxílio de uma pipeta de vidro foi coletado a aproximadamente 3 cm abaixo do nível da suspensão, imediatamente após homogeneização. A percentagem de nitrogênio foi determinada em 5,0 ml de amostra no início (0 horas), 24, 48, 72, 96 e 120 horas, sendo que cada determinação foram repetidas 4 vezes, totalizando 24 tubos de ensaio. Desses, foi selecionado aquele que teve a maior porcentagem de nitrogênio e foi reinoculado um volume correspondente a 0,2 mL da suspensão em quatro outros tubos para obtenção do

Inóculo Selecionado, conforme é descrito no item 3.4.1. O ajuste de peso antes da coleta e a forma de coleta (volumetricamente) foi igual ao experimento A.

3.5.3 Terceiro experimento de balanço de nitrogênio – Experimento C

O terceiro experimento de quantificação de nitrogênio, ou experimento C, foi conduzido sob temperatura constante de 28 °C em estufa de incubação. Colocou-se 8,000±1 g de fécula de mandioca da amostra I em tubo de ensaios de 16 x 150 mm, juntamente com 15 mL de água potável não tratada e 0,2 mL do Inóculo Selecionado proveniente do tubo, o qual conteve a maior percentagem de nitrogênio dentre os quatro tubos descritos no item 3.5.2. Antes da coleta de amostra foi feito ajuste do peso de cada tubo ao peso inicial. A coleta de amostra foi feita a 3,0 cm abaixo do nível da suspensão, através da pesagem exata de aproximadamente 5 g de suspensão e imediatamente após homogeneização manual. Portanto, a amostragem foi feita gravimetricamente e continha grânulos de amido em suspensão. Determinou-se a percentagem de nitrogênio no início (0), 24, 48 e 72 horas, sendo que cada determinação foram repetidas 4 vezes, totalizando dessa forma 24 tubos. Desses, foi selecionado aquele que teve a maior porcentagem de nitrogênio e foi reinoculado em quatro outros tubos, sendo esse procedimento parte da seqüência de obtenção do Inóculo Misto, conforme é descrito no item 3.4.1. Observa-se que no decorrer dos experimentos de quantificação de nitrogênio também foi desenvolvendo-se o procedimento de obtenção de inóculo.

3.5.4 Experimento com amostragem somente no líquido sobrenadante – Experimento D

O quarto experimento de quantificação de nitrogênio, ou experimento D, foi conduzido sob temperatura constante de 28°C em estufa de incubação, onde se colocou 6,000±1 g de fécula de mandioca da amostra I, 15 mL de água potável não clorada em frascos cilíndricos transparentes de 75x30 mm tipos Injeplast com 29 mL de volume e com tampa interna não rosqueável. Em cada frasco adicionou-se 0,2 mL de inóculo do tubo o qual conteve a maior porcentagem de nitrogênio dos quatro tubos descritos no item 3.5.3. Foram determinados os teores de nitrogênio no início (0) e 48 horas em amostras coletadas há 3 horas após a homogeneização manual do conteúdo interno dos frascos, sendo que cada determinação foi repetido sete vezes, totalizando 14 frascos. Antes da coleta de amostra, ajustou-se cada frasco com o peso correspondente ao início do experimento, em balança digital analítica marca AB204 Micronal. A coleta de amostra foi feita no líquido com a retirada de 6,0 mL da suspensão ao redor de 0,5 cm acima da interface entre a fécula decantada e o líquido sobrenadante. A amostra foi pesada com tubo de digestão assentado em um suporte dentro da balança. Colocou-se no tubo de digestão aproximadamente 5,000±1 g de amostra pesados exatamente.

3.5.5 Experimento com teste de inóculo – Experimento E

O quinto experimento de quantificação de nitrogênio, ou Experimento E, teve a finalidade de comparar variações no balanço de nitrogênio ao longo do tempo em

conseqüência da utilização conjunta do Inóculo Misto e Inóculo Selecionado durante a fase inicial do processo fermentativo de fécula de mandioca. O experimento foi conduzido sob temperatura constante de 28°C em estufa de incubação. Amostras foram coletadas no início (0 horas), 24, 48, 72 e 96 horas, com cinco repetições em cada tempo, totalizaram 50 unidades experimentais. Essas se constituíram de frascos cilíndricos transparentes de 75x30 mm tipos Injeplast com 29 mL de volume total e com tampa interna não rosqueável, onde se colocou 8,000±1 g de fécula de mandioca da amostra II e 17 mL de água potável não tratada, para o ensaio testemunha (sem inoculação). No ensaio com inoculação, além de 8,000±1 de fécula, foi adicionado 15 mL de água e 2 mL da mistura de quantidades iguais de Inóculo Selecionado e Inóculo Misto, conforme é descrito no item 3.4.

Antes da coleta de amostra, ajustou-se cada frasco com o peso correspondente ao que este apresentava no início do experimento, através de balança digital analítica marca AB204 Micronal. A coleta de amostra foi feita a aproximadamente 3,5 cm abaixo da borda dos frascos, sendo que a homogeneização foi manual. Foi retirado aproximadamente 6,0 ml da amostra, sendo que foi introduzido no tubo de digestão aproximadamente 5,000±1 g de amostra, pesados exatamente.

Após a coleta de amostra em cada frasco para determinação de nitrogênio total, foi determinado o teor de acidez titulável e pH para o acompanhamento do processo fermentativo de fécula de mandioca. O pH foi determinado da seguinte forma: o conteúdo em cada frasco foi homogeneizado manualmente até que as partículas ficaram uniformemente suspensas. Agitou-se ocasionalmente de forma manual por mais 30 minutos. Deixou-se em repouso por 10 minutos e decantou-se o líquido sobrenadante para outro frasco com as mesmas dimensões e determinou-se o pH introduzindo o eletrodo dentro desse. A

acidez titulável foi feita da seguinte forma: imediatamente após a leitura de pH verteu-se todo o conteúdo do frasco em um copo Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 80 mL de água destilada e 2 a 4 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. Sob agitação constante titulou-se com hidróxido de sódio 0,1N até a viragem do indicador. Os valores de acidez foram calculados considerando a quantidade em matéria seca de fécula da amostra II introduzida nos frascos no início do experimento, ou seja, $8,000 \pm 1$ g diminuído a umidade da amostra II. O procedimento de determinação de pH e acidez titulável apresentado acima seguiu o que descreve Instituto Adolfo Lutz (1985), com adaptações sendo feitas, devido a amostra não ser na forma de pó, mas sim na forma de suspensão de grânulos de amido. Todas as leituras de pH foram feitas com potenciômetro marca MS Tecnon, modelo PA200.

3.5.6 Experimento com amostragem no líquido sobrenadante e na fécula decantada – Experimento F

O Experimento F foi conduzido sob temperatura constante de 28°C em estufa de incubação, sendo que se utilizou frascos cilíndricos transparentes de 75x30 mm tipos Injeplast com 29 mL de volume e com tampa interna rosqueável, onde se colocou $6,000 \pm 1$ g fécula da amostra III (fécula comercial) juntamente com 15,0 mL de água potável não clorada. Foram determinados os teores de nitrogênio total no início (0), 48 e 72 horas, sendo que cada tempo foi repetido seis vezes, totalizando 18 frascos. A amostragem foi feita 3 horas após a homogeneização manual do conteúdo dos frascos, quando já estava bem definida a separação entre a fécula de mandioca decantada e o líquido sobrenadante. O líquido sobrenadante foi separado dos frascos, ficando nestes somente a fécula decantada. Foram coletadas

aproximadamente $3,000\pm 1$ g de amostra da fécula decantada e aproximadamente $5,000\pm 1$ g do líquido sobrenadante.

3.6 Verificação da presença do complexo enzimático da nitrogenase

A redução de acetileno para etileno ocorre por ação da nitrogenase, a qual confirma a presença do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico. Tal redução é tida como uma maneira indireta de comprovar a existência do referido processo. Com base nesse princípio, foi desenvolvido um experimento onde se conduziu o processo fermentativo de fécula de mandioca em dois tipos de ambientes fechados. Neles foi introduzido o gás acetileno e mediu-se o etileno via cromatografia gasosa. Tal experimento constitui-se uma adaptação daquele desenvolvido pioneiramente por Schollhorn & Burris (1967) e posteriormente desenvolvido por Boddey et al. (1994) para verificação do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico em plantas.

A construção do ambiente fechado para a condução do experimento com a introdução do gás acetileno e retirada de amostras da fase gasosa para análise em espectrometria de massa, compreendeu dois tipos de recipientes, segundo o volume total dos mesmos. O maior volume avaliado foram frascos de 1000 mL, onde se introduziu 200 g de fécula de mandioca da amostra II, juntamente com 200 ml da água potável, porém não clorada. Para os frascos onde foi testada a inoculação, além dessa quantidade de fécula e água, foi também adicionado 20 ml de mistura de quantidades iguais do Inóculo Misto e Inóculo Selecionado, como é descrito no item 3.4. Aproximadamente 600 ml restaram dentro dos frascos e esse volume constituiu a fase gasosa, onde foi introduzido o gás acetileno. A Figura 2

apresenta as dimensões e um corte transversal desse tipo de frasco, que apresenta vedação adequada do seu conteúdo interno, através de uma tampa rosqueável. Essa, por sua vez, possui um orifício selado com borracha onde é possível inserir e retirar volumes de gás através de uma seringa. Foram feitas análises de pH, acidez e determinação de etileno por cromatografia gasosa em 0 (início), 24, 48, 72 horas. Com o auxílio de uma seringa de 100 mL retirou-se 60 mL do ar interior em cada frasco ($\pm 10\%$). Em seguida injetou-se 60 ml de gás acetileno e os frascos foram colocadas em agitação durante 30 minutos. Após esse tempo foram retiradas 1,0 mL de amostra da fase gasosa de cada frasco e procedeu-se a análise em cromatografia gasosa. Os frascos continuaram sob agitação e o procedimento de leitura foi repetido em 1 hora e 2 horas após cada intervalo de tempo. Isso porque o tempo de 30 minutos pode não ser suficiente para que haja redução do acetileno a etileno em quantidades passíveis de serem detectadas pela cromatografia gasosa.

O outro tipo de unidade experimental utilizado para esse experimento foram frascos cilíndricos tipo Injeplast, com tampa interna não rosqueável, tendo volume total de 29 ml. Dentro foram colocados $8,000 \pm 1$ g de fécula de mandioca da amostra II e 17 ml de água, para o experimento testemunha. Para os frascos com teste de inoculação foram colocados a mesma quantidade de fécula de mandioca, porém com apenas 15,0 ml da mesma água e 2,0 ml de mistura de quantidades iguais do Inóculo Misto e Inóculo Selecionado, como é descrito no item 3.4. Dessa forma, totalizaram 16 frascos, sendo 8 com inoculação e 8 testemunhas (sem inoculação), para leitura em 0 (início), 8, 16, 24, 40, 48, 72 e 96 horas após o início da fermentação, a qual foi conduzida em temperatura constante de 28°C em estufa de incubação. Após cada determinação os frascos continuaram sob agitação e o procedimento de leitura foi repetido em 1 hora e 2 horas após.

A leitura em cromatografia gasosa ocorreu da seguinte forma: de cada frasco foi retirado a tampa interna e colocado uma outra de borracha, de forma a possibilitar a introdução da agulha de uma seringa de 1,0 mL sem permitir a troca de gases com o exterior. Através da seringa, retirou-se 0,5 ml do ar ($\pm 10\%$ da fase gasosa) e injetou-se 0,5 ml de acetileno. Em seguida os frascos foram colocadas em agitação durante 30 minutos. Após esse tempo, com a mesma seringa, retirou-se 1,0 ml do ar interior dos frascos e deixou-se estes ainda sob agitação dentro da estufa de incubação. Injetou-se a amostra no cromatógrafo a gás, sendo que esse procedimento de leitura foi repetido em 1 hora e 2 horas após. Após as leituras em cromatografia gasosa foram feitas análises de pH e acidez em todos os frascos.

As análise em amostras de ambos os tipos de frascos foram feitas com cromatógrafo a gás, modelo GC 65 Beckman com duas colunas tipo Poropak N e detector de ionização de chama, utilizando como gás de arraste o nitrogênio. Foram utilizados padrões de 5 e 500 ppm de etileno. Após leitura das amostras em cromatografia gasosa foram feitas determinações de pH e acidez titulável segundo Instituto Adolfo Lutz (1985), sendo que para os frascos com volume de 29 mL o procedimento metodológico teve as mesmas adaptações apresentada no item 3.5.5. Todas as leituras de pH foram feitas com potenciômetro marca MS Tecnon, modelo PA200.

Foi realizado um segundo experimento para verificação da atividade da nitrogenase com o mesmo procedimento metodológico descrito e utilizando os mesmos equipamentos, sendo que desta vez foi utilizado fécula de mandioca da amostra III, de origem comercial e descrita no item 3.2 e foi utilizado água potável não clorada da mesma origem que aquela utilizada no experimento F.

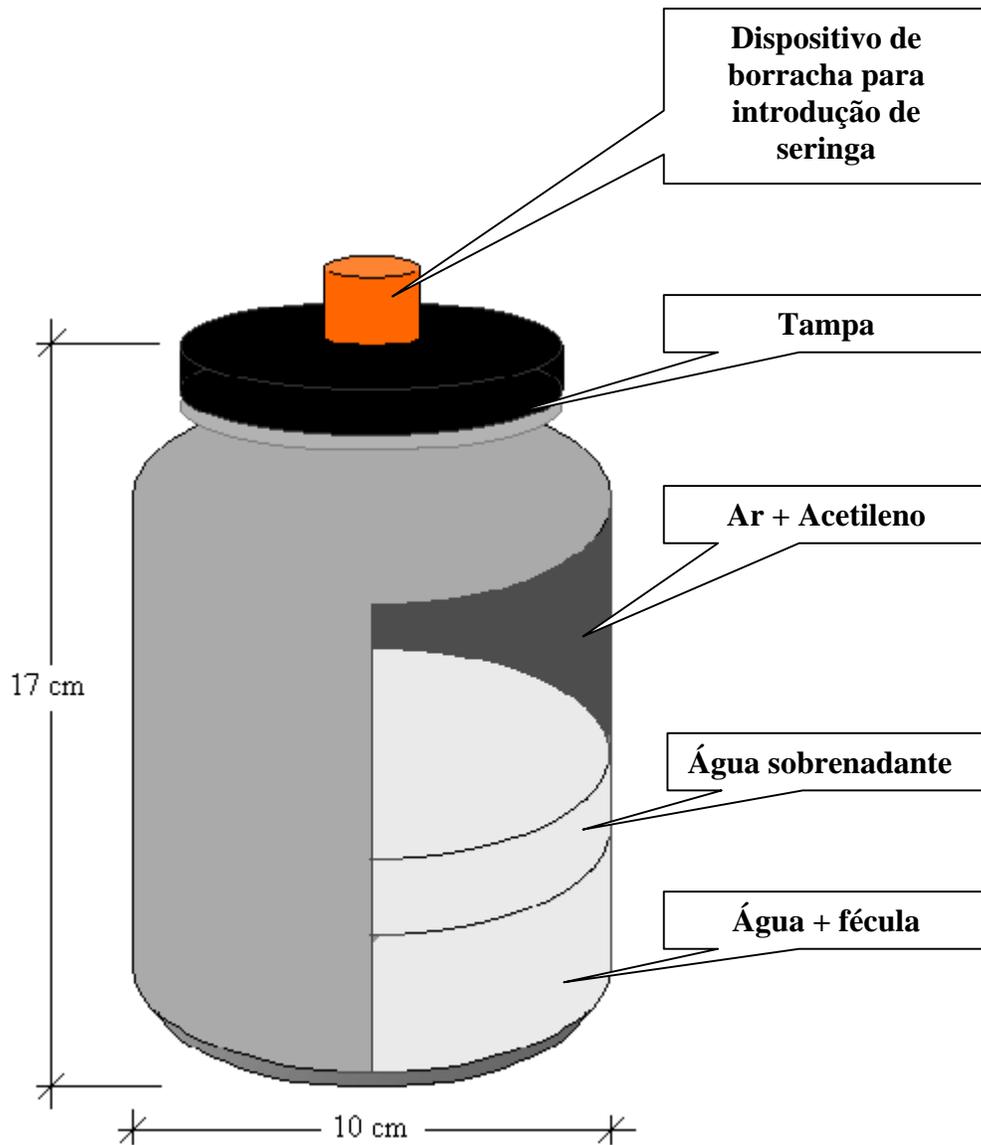


Figura 2. Frasco com volume de 1000 ml utilizado no experimento para verificação da presença do complexo enzimático nitrogenase na fase inicial do processo fermentativo de fécula de mandioca

3.7 Verificação da relação N^{15}/N^{14} via espectrometria de massa

O experimento é uma adaptação da metodologia descrita por Beaumont et al. (2000) avaliação de fixação de N_2 atmosférico em algas cianofíceas de ambiente aquático. No presente experimento considera-se por similaridade o ambiente como anaeróbio, ou microaerófilo onde ocorre a fermentação de fécula de mandioca. O experimento utilizou fécula de mandioca da amostra II e foi conduzido sob temperatura constante de 28 °C em estufa de incubação. As amostras foram coletadas em 0 (início), 24, 48, 72 e 96 horas após a o início do experimento. Foi coletado um volume de aproximadamente 40 μ L de amostra do líquido sobrenadante ou da fécula decantada após a retirada daquele. Os resultados foram expressos em δ ‰ (delta por mil), que representa a quantidade de isótopos ^{15}N para cada 1000 isótopos ^{14}N , como relatado por Boddey (1994). As análises foram feitas por espectrômetro de massa, marca Finnigan MAT, modelo Delta S, acoplado a um Analisador Elementar modelo EA1108CHN. O aparelho foi calibrado com medida padrão da abundância de ^{15}N do cilindro de gás de N_2 utilizado como padrão de laboratório, e o pico de referência para cada leitura de amostra (pico 2) calibrado segundo relação de massa isotópica N^{15}/N^{14} de sulfato de amônio, sendo ambas as calibrações descritas por Berrie & Prosser (1996).

O experimento foi conduzido em frascos cilíndricos tipo Injeplast de 29 mL, com tampa interna não rosqueável. Em cada frasco foram colocados $8,000 \pm 1$ g de fécula de mandioca proveniente da amostra II, 15 mL de água potável não clorada e 2 mL da mistura de quantidades iguais do Inóculo Misto e do Inóculo Selecionado, como é descrito no item 3.4. Para comparação também foi determinado a abundância de ^{15}N em fécula de mandioca

comercial, a qual será considerada como sendo substrato não fermentado, ou seja, similar às amostras do substrato no tempo 0 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hipótese da ocorrência do mecanismo biológico de fixação de N_2 atmosférico no processo de fermentação de fécula de mandioca teve fundamentação teórica no fato de que há uma fermentação vigorosa já em 24 horas, apesar do baixo teor de nitrogênio no meio, o que leva para uma relação C/N alta, conforme descreve Cereda (1973). Para que se estabeleça a existência atividade biológica, deve haver incorporação de nitrogênio no meio e a atmosfera é tida como uma das prováveis fontes do elemento. Dessa forma, a discussão dos aspectos mais relevantes mostrados pelos resultados obtidos durante todo o experimento considera o conjunto de procedimentos metodológicos que foram aplicados. Esses foram fundamentados nas características físico-químicas das amostras de fécula de mandioca utilizadas, no balanço do elemento nitrogênio em sua forma total na fase inicial do processo de fermentação de fécula de mandioca, na atividade do complexo enzimático da nitrogenase, a qual é responsável pela fixação de N_2 e, por fim, na investigação das alterações da relação isotópica $^{15}N/^{14}N$, quando da fixação e assimilação do elemento nitrogênio.

4.1 Características físico-químicas das amostras de fécula

As características físico-químicas das amostras de fécula de mandioca utilizadas para o experimento são apresentadas na Tabela 3. Observa-se que o teor de nitrogênio para a fécula da amostra I, II e III (fécula comercial) são respectivamente 0,09, 0,08 e 0,01%. Segundo Sarmiento et al. (1994), o teor de nitrogênio encontrado normalmente na fécula de mandioca é de 0,06% e dessa forma apenas a fécula da amostra III encontra-se com os teores desse elemento abaixo do normal. As amostras de fécula I e II, obtidas em laboratório, apresentam teores de nitrogênio um pouco acima do normal e isso pode ter incorrer em impedimentos quanto à ocorrência de fixação biológica de nitrogênio atmosférico no processo de fermentação, uma vez que concentrações desse elemento podem inibir tal processo quando acima de determinados níveis (LIMMER & DRAKE, 1998 e HILL, 1992). Embora as amostras de fécula I e II tenham teores de nitrogênio acima dos valores normais, ainda assim observa-se que a relação C/N apresenta-se elevada para os três tipos de amostras de fécula.

As amostras I e III apresentaram-se com valores de acidez titulável levemente acima de 0,94 ml de NaOH N/100g de matéria seca, valor esse citado por Sarmiento et al. (1994) como normal para fécula de mandioca. Porém a amostra II possuiu um valor aproximadamente três vezes maior (3,65 ml de NaOH N/100g de matéria seca) e isso pode indicar que nessa amostra parte do processo fermentativo já tenha ocorrido, conforme padrões de acidez descritos por Cereda (1973) para o processo de fermentação de fécula de mandioca. Essa hipótese é reforçada quando observamos pH com valor 4,48 nessa amostra, sendo que o valor normalmente encontrado para fécula de mandioca é de aproximadamente 6,2.

Tabela 3. Características físico-químicas das três amostras (I, II, III) de fécula de mandioca utilizados nos experimentos (média de duas repetições)

Parâmetros	Amostra I	Amostra II	Amostra III
Umidade %	8,57	12,37	3,92
pH	5,60	4,48	6,30
Acidez titulável *	1,54	3,65	1,40
% na matéria seca			
Nitrogênio total	0,09	0,08	0,01
Amido	96,94	89,1	88,33
Teor de carbono	43,08	39,59	39,25
Relação C/N	478,6	494,9	3925

(*) ml de NaOH N / 100 g de matéria seca

4.2 Desenvolvimento das fermentações

Todos os experimentos apresentaram os sinais de fermentação típicos de fécula de mandioca descritos por Cereda (1973). Entre 24 e 48 horas após o início do experimento se observou turvação da água sobrenadante e presença de bolhas na fécula decantada, que posteriormente subiam à superfície formando espuma. Com relação ao pH e à acidez titulável a maioria dos experimentos não tiveram esses parâmetros analisados, porém no experimento E de quantificação de nitrogênio, no qual foi testada a mistura do Inóculo Misto e do Inóculo Selecionado, o pH apresentou decréscimo rápido e a acidez aumentou conforme é apresentado no item 4.3. Também para o experimento de verificação da atividade enzimática da nitrogenase houve diminuição de pH e decréscimo da acidez titulável. Esses resultados mostraram que, nesse período do processo de fermentação ocorreram variações de pH e acidez titulável dentro dos padrões típicos.

4.3 Balanço de nitrogênio no substrato de fécula de mandioca

O balanço de nitrogênio no substrato de fécula de mandioca na fase inicial do processo de fermentação foi estabelecido em seis experimentos (experimentos A, B, C, D, E e F) onde foram determinados o conteúdo total do elemento nitrogênio ao longo dos primeiros cinco dias. A princípio, os resultados obtidos apontaram para a não confirmação da hipótese da ocorrência de fixação biológica de N_2 no referido processo.

Os valores de nitrogênio total no substrato de fécula de mandioca nos experimento A e B são apresentados na Tabela 4, e do experimento C são apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Valores de nitrogênio total ao longo do tempo no substrato de fécula de mandioca em dois experimentos, sendo experimento A conduzido em condições ambientais e experimento B com conduzido com temperatura constante de 28 °C. Média de quatro repetições. Resultados na coluna seguidos da mesma letra não diferem pelo teste Tukey ($F < 0,05$).

horas	Experimento A		Experimento B	
	% nitrogênio total	C.V.	% nitrogênio total	C.V.
0 (início)	0,00640 a	25,20	0,01007 a	6,97
24	0,00510 a	26,64	0,01075 a	14,11
48	0,00526 a	19,30	0,01177 a	8,09
72	0,00526 a	34,42	0,00980 a	13,80
96	0,00803 a	14,02	0,01109 a	2,37
120	0,00708 a	25,14	0,01008 a	6,03

Tabela 5. Teores de nitrogênio total no início (0), 24, 48 e 72 horas do processo de fermentação de fécula de mandioca (experimento C), com amostragem na suspensão com grânulos de fécula, média de quatro repetições. Resultados no mesmo experimento seguidos da mesma letra não diferem Tukey ($F < 0,05$)

horas	(%nitrogênio total)	Coefficiente de variação
0 (início)	0,07449 a	18,1
24	0,09033 a	
48	0,07851 a	
72	0,07187 a	

Tanto no experimento A, que foi conduzido em condições ambientais, como no experimento B que foi conduzido sob temperatura constante de 28 °C, não foi possível detectar variação do conteúdo de nitrogênio total durante o experimento. Ainda assim observou-se em ambos uma tendência de aumento às 96 horas. Confirmando o que ocorreu nos experimentos A e B, o experimento C, que também teve coleta de amostra na suspensão de água contendo fécula, não foram detectadas variações significativas de teor de nitrogênio total no substrato ao longo das 72 duas horas de duração do experimento, embora seja possível observar uma tendência de aumento 24 horas após o início da fermentação.

O fato de não haver sido detectado aumentos significativos de nitrogênio total na suspensão contendo água e fécula nos experimentos A, B e C quando comparado com o início (tempo 0) , supõe que não ocorreu nesses o processo de fixação biológica de N₂ atmosférico. Outra hipótese, entretanto, é de que quando a primeira amostra foi feita essa fixação já havia ocorrido. Um indício dessa constatação é o fato de que a amostra de fécula de mandioca utilizada para esses três experimentos (amostra I) possuía um valor de 0,09% de nitrogênio total, ou seja, uma vez e meio maior que a média de 0,06% encontrado normalmente na fécula de mandioca, conforme apresentam Sarmiento et al. (1994). O fato de que a amostra de fécula de mandioca utilizada para esses experimentos já teve uma concentração de nitrogênio acima dos

valores normais quando do início dos experimentos, aponta para a possibilidade de já haver ocorrido parte da fixação biológica de nitrogênio atmosférico durante o período entre a obtenção das amostras e o início do experimento.

Com relação à inoculação, a técnica de enriquecimento com a reinoculação de frascos ou tubos que contivessem a maior porcentagem de nitrogênio no experimento anterior, pode ter adicionado ao substrato pequena quantidade de nitrogênio, assim como contribuído para a acidificação do meio. Sendo essas condições antagônicas ao processo de fixação biológica de N_2 atmosférico, o processo de inoculação teria provocado um impedimento, ao invés potencializar o processo de fixação biológica de N_2 atmosférico no substrato.

Os resultados do experimento D, o qual também foi realizado com fécula da amostra I, mas com amostragem somente no líquido sobrenadante após três horas de repouso, são apresentados na Tabela 6. Observa-se que houve variação no conteúdo de nitrogênio total e o resultado é significativo mesmo para o nível 1% de significância. Houve, portanto, um aumento de nitrogênio total em até 28% no líquido sobrenadante do substrato de fécula de mandioca às 48 horas após o início do processo fermentativo o que está de acordo com o que fora observado por Cereda & Giav-levra (1987).

Tabela 6. Teores de nitrogênio total no início (0) e 48 horas (experimento D), com amostragem somente no líquido sobrenadante após três horas de repouso, média de sete repetições. Resultados no mesmo experimento seguidos da mesma letra não diferem Tukey ($F < 0,05$)

horas	(% nitrogênio total)	Coefficiente de Variação (%)
0 (início)	0,01993 a	5,442
48	0,02555 b	

Esse aumento pode ter sido ocasionado pela presença de microorganismos na fermentação natural de fécula de mandioca, como apontaram Cereda (1973) e Ampe (2001), bem como ocasionado por microorganismos presentes no inóculo utilizado. Porém, nesse experimento o incremento de nitrogênio total no líquido sobrenadante pode ter sido originado pela migração do elemento nitrogênio da fécula decantada. A atividade biológica da fase inicial do processo de fermentação pode ter transformado o nitrogênio orgânico dos grânulos da fécula decantada em formas solúveis.

Se no experimento D houve aumento de nitrogênio no substrato pela presença do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico, pode-se dizer que a amostra de fécula utilizada não continha impedimentos à realização de fixação biológica de N_2 conforme foi proposto para os resultados obtidos nos experimentos A, B e C. Ou seja, a não ocorrência de aumentos de nitrogênio total no substrato dos experimentos A, B e C pode ter sido ocasionado pelo teor de nitrogênio e valores de acidez acima do normal na amostra de fécula utilizada como substrato e isso poderia ter inibido o processo de fixação biológica de nitrogênio durante o processo de fermentação. Porém, no experimento D, que também foi realizado com a mesma amostra de fécula, houve aumento de nitrogênio no decorrer do experimento. Se esse aumento foi tido como proveniente do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico, pode-se considerar que nos experimentos A, B e C o teor de nitrogênio e as condições de acidez da amostra de fécula utilizada não foram impeditivas para a realização de fixação biológica de nitrogênio.

Considerando as duas formas de amostragem, ficou evidente o aumento de nitrogênio total quando da amostragem somente no líquido sobrenadante após três horas de repouso no processo de fermentação de fécula de mandioca, induzido pela inoculação ou não.

Como até o momento não havia sido comprovado um aumento desse elemento quando da amostragem imediatamente após a homogeneização, isto é, com amostragem da suspensão de água contendo grânulos de fécula, procedeu-se a realização do experimento E, cujos resultados do balanço de nitrogênio total são apresentados na Tabela 7 e os resultados de pH e acidez são apresentados na Figura 3. Nesse experimento, a hipótese da utilização de um inóculo como indutor de incremento do nitrogênio total foi testada, introduzindo-se um tratamento com inoculação, onde utilizou-se conjuntamente partes iguais de Inóculo Misto e o Inóculo Selecionado, conforme descrito no item 3.4, comparado com outro tratamento onde não foi utilizado qualquer tipo de inoculação.

Em nenhum tratamento com inoculação foi observado aumento ou diminuição de nitrogênio total no substrato. Porém, no tratamento sem inoculação, embora também não tenha havido um aumento da concentração desse elemento, observou-se uma redução ao final de 96 horas após o início do experimento. Tomando-se como referência porcentagem de nitrogênio total no início do experimento, qual seja de 0,02872 %, pode-se expressar que tal redução foi de 3,69 %.

Tabela 7. Resultados em porcentagem de nitrogênio ao longo do tempo em fermentação de substrato de fécula de mandioca, com e sem inoculação. Média de cinco repetições. Números seguidos da mesma letra na coluna não diferem (Tukey $F < 0,05$); C.V.=3,65%

Tempo (h)	Com inoculação ¹ (%)	Sem inoculação (%)
0	0,02897 a	0,02872 a
24	0,02808 a	0,02838ab
48	0,02880 a	0,02840 a
72	0,02859 a	0,02963 a
96	0,02761 a	0,02766 b

¹Inoculo obtido da mistura de partes iguais de Inoculo Misto e Inóculo Selecionado

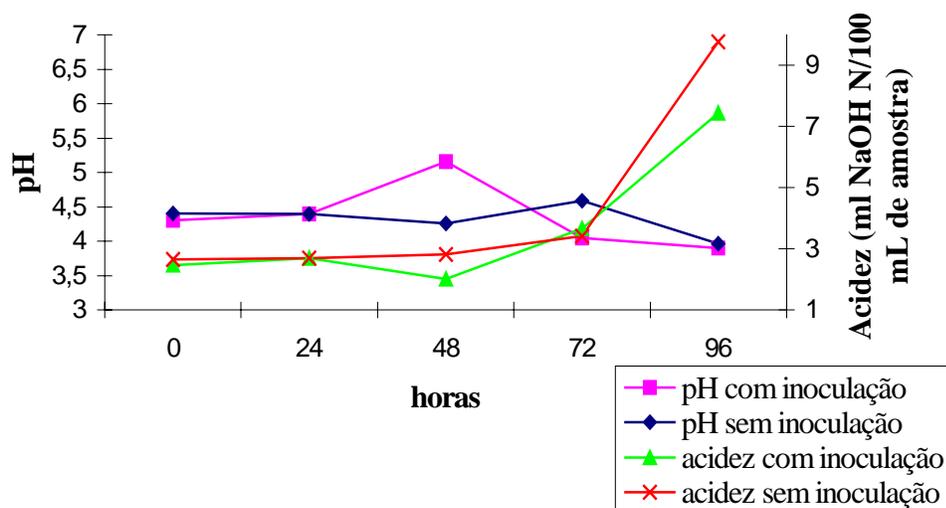


Figura 3. Valores de pH e Acidez no meio fermentativo de fécula de mandioca com inoculação e sem inoculação. Média de cinco repetições.

A acidez inicial dos experimentos com e sem inoculação foram semelhantes e próximos a 3,0 ml NaOH N/100 mL de amostra. Ao final de 96 horas, apresentaram valores de 7,5 e 10,0 ml NaOH N/100 mL, para tratamento com inoculação e sem inoculação, respectivamente. A variação maior observou-se no último período do ensaio, qual seja, de 72 a 96 horas. Por outro lado, em ambos os ensaios o pH iniciou com valores próximos de 4,3 e terminaram com valores de 3,8. Ainda quanto ao pH observa-se no tratamento com inoculação, que o valor desse dois dias após o início da fermentação foi próximo de 5,5 e reduziu três dias depois.

O fato de não ter ocorrido incrementos de nitrogênio aponta para a não ocorrência do processo de fixação de nitrogênio atmosférico durante o experimento E. Por outro lado, da mesma forma que os experimentos A, B e C, as condições da amostra de fécula utilizada para o experimento (amostra II) pode indicar que o processo de fixação biológica pode ter ocorrido antes do início do experimento. Isso porque a fécula utilizada continha um teor de

nitrogênio de 0,08 %, valor esse um pouco acima de valores normais, conforme apresentam Sarmiento et al. (1994). Da mesma forma, os valores de pH e acidez já mostravam alterações que apontavam para a possibilidade de já haver ocorrido parte do processo fermentativo antes do início do experimento.

Com relação ao efeito de inoculação no experimento E, pode-se observar um decréscimo de nitrogênio total no último estágio (96 horas) nos tratamentos testemunha, onde não houve inoculação. A ocorrência desse decréscimo, quando comparado com o mesmo estágio do tratamento onde houve a inoculação, indica a possibilidade de ter havido efeito do inóculo no conteúdo de nitrogênio total, de maneira que, se não ocorreu o suficiente para aumentar esse conteúdo, pelo menos ocorreu o suficiente para manter as possíveis perdas por denitrificação. A denitrificação é um processo de respiração anaeróbia levado a efeito por certos microorganismos anaeróbios facultativos capazes de reduzir moléculas de nitrato ou nitrito para formas gasosas de nitrogênio, principalmente N_2 e N_2O (VICTORIA et al. 1995). Dentre esses microorganismos encontram-se os gêneros *Bacillus* e *Propionibacterium*, os quais também são citados por Cereda (1973) como presentes no processo de fermentação de fécula de mandioca.

Dentre todos os experimentos realizados com amostragem na suspensão homogeneizada, o experimento E é o único que apresenta resultados que podem comprovar uma possível ocorrência do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico. Isso também corrobora com a possibilidade da existência conjunta desses dois eventos no processo de fermentação de fécula de mandioca, quais sejam da perda de nitrogênio para a atmosfera e entrada desse elemento para o substrato, via fixação biológica. Assim sendo, o procedimento metodológico do balanço de nitrogênio fica comprometido quando da possibilidade do mesmo ser usado na

verificação do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico na fermentação de fécula de mandioca.

Em todos os experimentos de quantificação de nitrogênio total realizados, observou-se que aumentos desse elemento ocorreram apenas no experimento D, onde o procedimento de amostragem foi apenas no líquido sobrenadante. Tal incremento de nitrogênio total poderia ter duas origens, quais sejam, o N_2 atmosférico sobre o líquido sobrenadante ou o nitrogênio da própria fécula decantada. Assim sendo, realizou-se o experimento F onde se fez a determinação do elemento nitrogênio não somente no líquido sobrenadante, mas também na fécula decantada e cujos resultados são apresentados no Tabela 8. Nesse experimento foi utilizado como substrato a fécula da amostra III, fécula comercial, com 0,01 % de nitrogênio total na matéria seca, acidez em torno de 1,40 ml de NaOH N / 100 g de amostra seca e pH 6,30. Também não foi utilizado o procedimento de inoculação para que não fossem alteradas essas condições iniciais de pH e acidez.

Tabela 8. Teores de nitrogênio total no substrato de fermentação de fécula de mandioca no início (0), 48 e 72 horas após, no líquido sobrenadante e na fécula decantada com amostragem após três horas de repouso (média de seis repetições). Resultados seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem Tukey ($F < 0,05$)

horas	(% nitrogênio total)		
	Líquido sobrenadante C.V = 10,3%	Fécula decantada C.V. = 10,6%	Líquido sobrenadante + fécula decantada
0 (início)	0,001806 b	0,004798 a	0,006604 a
48	0,001911 a	0,003567 b	0,005478 a
72	0,002568 a	0,002894 c	0,005462 a

Observa-se que houve confirmação do aumento do teor de nitrogênio total no líquido sobrenadante em decorrência do processo de fermentação de fécula de mandioca,

assim como houve no experimento D e também como já haviam observado Cereda & Giav-
Levra (1987). A diferença nesse experimento é que o aumento não se confirmou em 48 horas
após o início do processo, porém confirmou-se em 72 horas, com um valor calculado em 42,2%
maior. Por outro lado, houve diminuição do teor de nitrogênio total na fécula decantada de forma
decrecente ao longo do tempo. Quando comparado com o início do processo de fermentação,
observar-se que em 48 horas a concentração de nitrogênio diminuiu 25,6 % e após 72 horas
diminui 39,68%. Tais resultados apontam para a ocorrência de migração de nitrogênio da fécula
decantada para o líquido sobrenadante. Por outro lado, observa-se que a soma do teor de
nitrogênio total do líquido sobrenadante e da fécula decantada durante o experimento
permaneceu inalterada. Isso evidencia a não entrada de nitrogênio no sistema e esse resultado
reforça a hipótese de que durante esse experimento não ocorreu o processo de fixação biológica
de nitrogênio atmosférico.

Observa-se, portanto, que o experimento D e o experimento F tiveram
comportamentos semelhantes quando se constata que houve um aumento de nitrogênio total no
líquido sobrenadante. Considerando o fato de que no experimento D houve inoculação e no
experimento F não houve, o procedimento de inoculação pode não ter tido efeito quando do seu
objetivo de realizar incrementos de nitrogênio total quando considerado apenas o líquido
sobrenadante, visto que esse aumento ocorre mesmo sem o procedimento de inoculação. Da
mesma forma, a diferenciação das características químicas dos dois tipos de fécula utilizada em
cada experimento não são significativamente importantes a ponto de diferirem quanto à
capacidade de provocar incrementos de nitrogênio total no líquido sobrenadante.

4.4 Verificação de atividade enzimática da nitrogenase

A hipótese da existência de processo de fixação biológica de N_2 na fase inicial da fermentação de fécula de mandioca (primeiras 96 horas) tem como procedimento metodológico à confirmação ou não da presença do complexo enzimático da nitrogenase. Esse conjunto de enzimas é fundamental na quebra da ligação tríplice da molécula de N_2 que é um gás abundante na atmosfera, e transformação do elemento N em formas moleculares solúveis e de fácil assimilação pelos organismos vivos. O complexo enzimático da nitrogenase não é passível de ser determinado diretamente pela cromatografia gasosa. Porém, essas moléculas podem ser detectadas de forma indireta por esse princípio metodológico através da propriedade que elas têm de reduzir a molécula de acetileno a etileno.

Com base nesse princípio, foi desenvolvido um experimento onde se conduziu o processo fermentativo de fécula de mandioca em seu estágio inicial em dois tipos de ambientes fechados com quantidades diferentes de substrato, volume de água, inoculação e volume da fase gasosa. Neles foi introduzido o gás acetileno e procedeu-se a detecção do etileno remanescente via cromatografia gasosa. Determinou-se também o pH e a acidez no substrato, visto que esses dois parâmetros são tidos como fundamentais para monitorar o processo fermentativo em estudo, conforme descreve Cereda (1973).

Tanto no experimento com a fécula de mandioca da amostra I, como na sua repetição com a fécula de mandioca da amostra III, que era uma fécula comercial, não houve evidência da presença de etileno, comprovado pela ausência de pico na região de detecção desse. A Figura 4 apresenta dois cromatogramas, um para cada tipo de amostras de fécula de mandioca utilizadas, quais seja amostra I e amostra III, ambos obtidos em 48 horas após o início do processo fermentativo.

A região 1 apresenta-se plana e nela que deveria manifestar-se o pico de etileno, que supostamente deveria originar-se do acetileno reduzido pela presença do complexo enzimático da nitrogenase proveniente da amostra. A ausência de pico na região do etileno ocorreu em todas as amostras lidas, o que indica que não houve presença do complexo enzimático da nitrogenase, uma vez que não houve redução de acetileno a etileno e tal comparação é feita com a região 2 dos cromatogramas onde o pico representa o padrão de 500 ppm de etileno utilizado nas leituras.

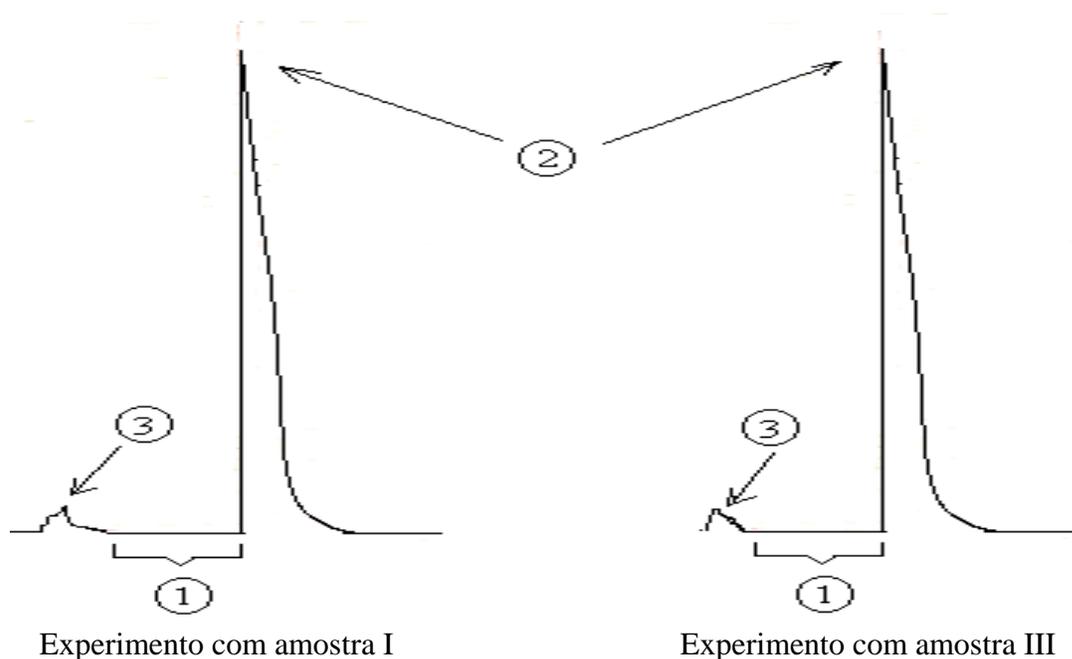


Figura 4. Cromatogramas obtidos em 48 horas após o início da fermentação em experimento com a amostra I de fécula de mandioca e com amostra III, sendo: 1- região de detecção do pico de etileno; 2 – pico do padrão de 500 ppm de etileno; 3 – pico de detecção de gás metano.

Em ambos experimentos ocorreram o processo de fermentação natural de fécula de mandioca como descrito por Cereda (1973), indicados pela redução do pH e conseqüente acidificação do substrato, bem como a presença de bolhas de gás e turvação do

meio. A formação de gás, além de caracterizada visualmente, foi estabelecida pela detecção de gás metano nos dois experimentos, onde nos cromatogramas da Figura 4 são apontados no pico número 3. A formação de gás metano é comum no procedimento metodológico de verificação da atividade enzimática da nitrogenase via cromatografia gasosa, devido a transformações químicas da molécula de acetileno que podem ocorrer, conforme constatou Tsai*.

Com relação ao pH e acidez, a fécula de mandioca da amostra I apresentava valores iniciais de pH e acidez de 5,60 e 1,54 mL de NaOH N/100 g de matéria seca, respectivamente, quando da sua utilização como substrato para o início do experimento. Na repetição do experimento, utilizando-se fécula comercial (amostra III), esta apresentava valores de pH e acidez da ordem de 6,30 e 1,40 mL de NaOH N/100g de matéria seca, respectivamente. Ao final do experimento após 72 horas, com a fécula de mandioca da amostra I apresentou valores de pH e acidez da ordem de 3,30 e 5,25 mL de NaOH N/100g de matéria seca e a fécula comercial (amostra III), ao final do experimento apresentou valores de pH e acidez da ordem de 3,71 e 6,12 mL de NaOH N/100g de matéria seca, respectivamente.

Para o experimento conduzido com a amostra A, inexistência da redução de acetileno a etileno pode ser atribuída ao fato de que havia uma concentração de nitrogênio

* TSAI, S. M. (CENA/USP - Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP), Comunicação pessoal, 2002.

de 0,09% na amostra e sendo considerada acima de valores normais apresentados por Sarmiento (1994). Essa concentração de nitrogênio na amostra de fécula utilizada pode ter sido suficiente para inativar o complexo enzimático da nitrogenase, como observam Limmer & Drake (1998) e Hill (1992). Porém, quanto ao outro experimento, onde foi utilizada a fécula da amostra C,

também não ocorreu redução de acetileno a etileno e essa amostra contém concentração de nitrogênio de 0,01%, abaixo de valores normais citados por Sarmiento et al. (1994). A verificação da existência do complexo enzimático da nitrogenase apontou para a não ocorrência do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico no processo fermentativo em estudo. Ainda assim não se pode descartar a hipótese de que tal processo tenha ocorrido, uma vez que o procedimento metodológico utilizado tenha sido adaptado e isso incorrer em erros, como a ocorrência de condições que podem inativar temporariamente o complexo enzimático da nitrogenase.

4.5 Discriminação isotópica de ^{15}N pelo processo fermentativo

A Tabela 9 apresenta a três leituras em espectrometria de massa da discriminação isotópica de ^{15}N em relação ao total de isótopos de N, ou seja, o valor δ ‰ (delta por mil) $^{15}N+^{14}N$. Isso em amostras no substrato de fécula de mandioca coletadas em 24 e 72 horas após o início do experimento. Para que os valores de δ ‰ sejam aceitáveis em termos de significância estatística, a amplificação da voltagem induzida pelo montante de isótopos da amostra lida (pico 2) deve ser aproximado da voltagem de referência do aparelho (pico 1). Isso é observado na leitura de calibração do aparelho em relação a um padrão de referência, onde o pico 1, com 2.032 volts é aproximado do pico 2 com 1.983 volts.

No presente experimento foi testada a aplicabilidade de amostras de substrato de fermentação de fécula de mandioca através da análise em espectrometria de massa para a verificação da existência de variação da relação isotópica $^{15}N/^{14}N$. Essa relação isotópica pode ser utilizada como indicador da ocorrência do processo de fixação biológica de N_2

atmosférico, pelo fato de tal relação sofrer variações quando das reações enzimáticas da quebra do dinitrogênio até a sua assimilação nas formas orgânicas. Em termos práticos, a fécula de mandioca no início da fermentação teria uma relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ um pouco maior que nos estágios subseqüentes, pois no decorrer do processo biológico haveria preferência, por parte de determinados estágios do processo enzimático, de substratos portadores do isótopo ^{14}N e a tendência seria de que a relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ diminuísse.

Tabela 9. Leitura em espectrometria de massa da discriminação do isótopo ^{15}N (δ ‰) e correspondente pico de voltagem do aparelho (pico 1) em amostras (pico 2) coletadas em 24 e 72 horas após o início de processo fermentativo de fécula de mandioca e padrão de referência

Pico	24 horas		72 horas		Padrão	
	Amplificação (volts)	δ ‰	Amplificação (volts)	δ ‰	Amplificação (volts)	δ ‰
aparelho	2,243	-1,20	2,085	-1,20	2.032	-1,20
amostra	1,115	10,83	0,267	-1,73	1.983	2,88

Em todas as leituras de amostras do experimento feitas para determinação da relação isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ no substrato de fécula de mandioca, a amplificação da voltagem não foi suficiente para atingir números significativos, ou seja, números próximos ao pico determinado pelo aparelho (pico 1). Nos resultados apresentados na Tabela 9, a amostra coletada em 24 horas após o início da fermentação mostrou leitura da discriminação isotópica em 1,115 de isótopos de ^{15}N para cada 1000 isótopos de ^{14}N . Tal valor só teria significância se a voltagem apresentada no pico de leitura (pico 2) fosse próximo do pico de referência do aparelho para essa amostra, que é de 2,243 volts. Como a voltagem ficou abaixo da metade desse valor, não se considera o valor da discriminação isotópica como significativa pela possível incorrência em

erro. Dessa forma, o valor da discriminação isotópica apresentada para a amostra colhida em 24 horas após o início da fermentação (10,83 átomos de ^{15}N para cada 1000 átomos de ^{14}N) não pode nesse caso ser objeto de conclusões utilizando o mesmo como um indicador do processo biológico de fixação de N_2 atmosférico. Em outras palavras, a não proximidade entre o pico de referência do aparelho (pico 1) e o pico de leitura da amostra (pico 2), indica que não houve concentração mínima de nitrogênio na amostra que permitisse uma leitura segura da discriminação de isótopos ^{15}N .

Supondo concentrações de nitrogênio próximas de 0,1% em uma amostra, haveria a necessidade de concentrar tal amostra em aproximadamente 15 vezes para que houvesse uma quantidade de nitrogênio suficiente para ser detectada a relação isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Isso porque a leitura em espectrometria de massa realizada necessitaria de, no mínimo, 60 μg de nitrogênio total em um volume de amostra de 40 μl litros, sendo esse o volume máximo injetável.

O procedimento de verificação da discriminação do isótopo ^{15}N via espectrometria de massa não permitiu qualquer resultados que levasse a conclusões sobre a ocorrência ou não de atividade microbiana pertinente à fixação biológica de N_2 atmosférico no processo de fermentação de fécula de mandioca. Porém ta experimento foi importante no sentido de demonstrar que a espectrometria de massa, quando aplicada para leitura de amostras do substrato de fécula de mandioca fermentado em seu estado natural, ou na própria fécula comercial, fica impossibilitada de oferecer resultados dentro das margens de segurança para a análise de dados, em função da pouca concentração de nitrogênio na sua constituição química e do pouco volume de amostra máxima a ser injetada no equipamento.

4.6 Resultados e forma de amostragem

A constatação de ter havido ou não aumentos de nitrogênio durante o balanço no processo de fermentação ocorrido nos experimentos em estudo, passa necessariamente por uma interpretação do tipo de amostragem que se teve adotado. Amostragem imediatamente após a homogeneização total do conteúdo, como foi o caso dos experimentos A, B, C e E, é sem dúvida a forma mais correta de amostragem única do ponto de vista da sua representatividade do conteúdo total. Porém pode apresentar quantidades não correlacionadas com aquelas que são obtidas quando a amostragem é feita apenas no líquido sobrenadante após três horas de repouso como foi o caso dos experimentos D e F.

Uma amostragem imediatamente após a homogeneização do conteúdo das unidades experimentais supõe que quantidades proporcionais de fécula e líquido sobrenadante são coletadas. Considerando que, se houve fixação biológica de N_2 atmosférico, esse nitrogênio deverá se apresentar somente dissolvido no líquido sobrenadante e não no volume correspondente à fécula decantada, que é constituída quase que exclusivamente de amido. Dessa forma, quando da amostragem da suspensão homogeneizada, no mínimo metade da amostra não apresentaria variações de nitrogênio com relação o tratamento inicial, pois seu nitrogênio apresentar-se-ia juntamente com aquele constituinte dos grânulos de fécula e estaria imobilizado na forma orgânica. Portanto, esse tipo de amostragem apresenta-se pouco representativo, pois tende a abranger também pouco do nitrogênio que possa ter sido originado do processo de fixação biológica de N_2 atmosférico.

A amostragem no líquido sobrenadante, por outro lado, apresenta-se como solução para o problema apontado quando da amostragem feita somente na suspensão com grânulos de fécula, pois, como já foi observado, se houve fixação biológica de N_2 atmosférico

ele está em sua grande maioria dissolvido na fase líquida. Porém, amostragem somente no líquido sobrenadante, como foi o caso do experimento D, apesar de confirmar um aumento de nitrogênio após 48 horas do início do experimento, também pode representar quantidades de nitrogênio que pode ter vindo da fécula decantada, como foi confirmado no experimento F.

4.7 Relação carbono/nitrogênio na fécula e no substrato da fermentação

Constatada a possibilidade de ter sido a fécula decantada o lugar de origem do nitrogênio aumentado no líquido sobrenadante, ainda assim fica a ser explicada a fermentação vigorosa que ocorre em apenas 24 horas do processo fermentativo, uma vez que a quantidade de nitrogênio total no substrato é muito pouca ($< 0,06\%$) em relação à grande quantidade de carbono (aproximadamente 44%), condicionando uma relação C/N de aproximadamente 733/1.

Uma das possíveis explicações para isso seria o fato de que uma alta relação C/N na amostra de fécula de mandioca na forma de fécula utilizada como substrato, cai para valores relativamente baixos quando do início do processo fermentativo, sem, entretanto haver aporte de nitrogênio de fora do sistema. Quando se adiciona água na amostra de fécula de mandioca, ficam constituídas duas fases físicas, onde uma é representada pela massa dos grânulos de fécula e outra fase será constituída pelo líquido ao redor dos grãos. A fase líquida imediatamente irá dissolver parte do nitrogênio mineral que possa estar na superfície ou mesmo solto entre os grãos. A fase líquida também vai conter uma pequena parte do carbono, formadas por moléculas de maltotetraoses, maltotreoses, maltose e glicose no meio de cultivo como afirma Cereda et al. (1982), quando da explicação da origem do nitrogênio nesse meio fermentativo.

A fase que contém os grãos de fécula continua com uma alta relação C/N. Já a fase líquida, por menor que seja o nitrogênio dissolvido na mesma, terá uma relação C/N não tão alta, uma vez não poderá comportar grandes quantidades de moléculas orgânicas dissolvidas, ou mesmo na forma de suspensão. Como a atividade metabólica da flora microbiana responsável pelo processo de fermentação ocorre necessariamente em contato com a fase líquida, a relação C/N dessa não atuaria de forma limitante quanto ao fato de haver uma fermentação vigorosa em apenas 24 horas.

Há, portanto, no meio fermentativo de fécula de mandioca duas fases com relações C/N diferentes, sendo que aquela da fase líquida onde ocorre uma imediata fermentação vigorosa tem relação C/N baixa. Dessa forma, pode-se excluir a necessidade de haver aporte de nitrogênio de fora do meio, via fixação biológica de N_2 atmosférico, uma vez que o pouco nitrogênio do substrato de fermentação é suficiente para a atividade metabólica da microbiota que realiza o processo fermentativo. Essa pouca quantidade de nitrogênio juntamente com pouca quantidade de carbono que vai para a fase líquida propicia uma baixa relação C/N no meio o que favorece uma fermentação vigorosa e rápida.

4.8 Perdas de massa e procedimentos de correção

Partindo-se do pressuposto que não há aumento da concentração de nitrogênio total no substrato em fermentação, falta explicar o fato de que o polvilho azedo que é o produto final do processo de fermentação de fécula de mandioca, contenha uma concentração

de nitrogênio em média quatro vezes maior, como observam Sarmiento et al. (1994). O balanço de massa pode ser explicação para tal fato, uma vez que no processo de fermentação de fécula de mandioca há significativa perda de massa na forma de gás carbônico, enquanto que com o nitrogênio, possivelmente não ocorram perdas de forma tão acentuada. Assim, que ocorre no processo de produção de polvilho azedo é um aumento do teor de nitrogênio em relação à massa total, em função desta diminuir devido a perdas por CO_2 e aquele tender a se manter nos mesmos níveis.

Esse fato é concordante com a constituição de amido na matéria seca na fécula de mandioca e no polvilho azedo como apresenta Sarmiento et al. (1994). Na matéria seca da fécula de mandioca foi encontrado aproximadamente 98,1% de amido e na matéria seca do polvilho azedo 95,5%. Possivelmente há uma perda muito maior de carbono e oxigênio durante o processo de fermentação de fécula de mandioca até a obtenção de polvilho azedo, considerando a massa inicial. Para isso seria necessário fazer um balanço de massa total, desde o início da fermentação até o final com rígido controle da perda de massa.

A correção do peso da amostragem antes da coleta de amostras para determinação de nitrogênio significa adicionar água destilada até o peso que a unidade experimental tinha quando do início do experimento é tida como imprescindível, pois ao longo do tempo há perda de massa na forma de água evaporada, gás carbônico e outros gases durante o período de fermentação como observaram Cereda et al. (1984). Com tal procedimento, considera-se que os valores obtidos no balanço de nitrogênio podem ser corretos, uma vez que variações do conteúdo total de nitrogênio só podem ser avaliadas considerando uma mesma massa total ao longo do tempo de realização do experimento.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Embora não tenha sido possível confirmar a existência de fixação biológica de N₂ atmosférico durante a fase inicial do processo de fermentação de fécula de mandioca, os resultados obtidos enfatizam a necessidade de estudos quanto aos seguintes tópicos: rastreamento de isótopos de ¹⁵N nas três fases físicas do sistema de fermentação; monitoramento de níveis de nitrogênio no meio que não incorram em inativação do complexo enzimático da nitrogenase; amostragem representativa na suspensão com grânulos de fécula; características físico-químicas da fécula a ser utilizada como substrato e alterações do substrato pelo procedimento de inoculação.

Primeiramente, com relação ao procedimento de verificação da discriminação isotópica ¹⁵N/¹⁴N via espectrometria de massa, sugere-se tomar atenção a dois aspectos, a saber: (1) viabilizar uma técnica no sentido de aumentar a concentração de nitrogênio total no substrato, de forma que a mesma tenha valores mínimos suficientes para detecção da relação ¹⁵N/¹⁴N via espectrometria de massa; (2) verificar a discriminação

isotópica não somente da fécula decantada ao fundo das unidades experimentais, como foi avaliado no presente experimento, mas também no líquido sobrenadante e na atmosfera acima desse. Dessa forma, através da leitura da discriminação do isótopo ^{15}N entre essas três fases, haveria condições de rastrear átomos de nitrogênio e verificar se houve deslocamento desses por entre aquelas.

O procedimento metodológico conduzido no presente trabalho para a presença do complexo enzimático da nitrogenase apresentou resultado negativo durante o processo de fermentação de fécula de mandioca. Embora o teste positivo comprove a existência de mecanismo de fixação biológica de N_2 atmosférico, a sua não detecção não elimina esta hipótese. Concentrações significativas de formas nitrogênio mineral como nitrito e amônio, bem como a presença de ácidos orgânicos no meio tende a inativar temporariamente o complexo enzimático da nitrogenase, como observam Limmer & Drake (1998) e Hill (1992). Assim, sugere-se desenvolver procedimentos metodológicos de modo a conduzir a verificação via cromatografia gasosa exatamente nos períodos onde não há saturação dessas moléculas no meio.

O balanço de nitrogênio no decorrer do processo fermentativo de fécula de mandioca também apresentou limitações, quais foram: (a) dificuldade de amostragem no sentido de coletar uma amostra representativa do substrato em estudo, devido a pequena concentração de nitrogênio, (b) seleção de substrato de fermentação com características mais freqüentes da fécula de mandioca, com relação a concentração de nitrogênio, pH, acidez e teor de umidade; (c) dificuldade de monitorar simultaneamente quantidades de nitrogênio perdidas para a atmosfera sob formas gasosas e quantidades de nitrogênio que hipoteticamente entram no substrato via fixação biológica de N_2 atmosférico.

Finalmente, o procedimento metodológico de inoculação, ao mesmo tempo em que pode favorecer determinados grupos de microorganismos, pode também apresentar inconveniências tais como o fato de alterar características químicas do meio, como por exemplo a concentração de nitrogênio total, pH e acidez titulável, quando do início do experimento. Tais alterações podem inviabilizar esse estágio do processo fermentativo de fécula de mandioca como referência à comparação com os demais estágios subsequentes. Sugere-se fazer um estudo da relação entre o volume de inóculo proposto e aquele que possa ser utilizado sem alterar significativamente as características químicas do meio fermentativo.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que a pesquisa foi desenvolvida, não foi possível constatar evidências da existência de incremento de nitrogênio no substrato durante a fase inicial do processo de fermentação de fécula de mandioca. Houve indícios da existência do processo quando da observação de manutenção dos níveis de nitrogênio nos ensaios com inoculação. Houve aumento do teor de nitrogênio no líquido sobrenadante em 72 horas após o início do processo de fermentação ao mesmo tempo em que houve diminuição do mesmo na fécula decantada.

Com relação à detecção de atividade biológica relacionada à fixação biológica de N_2 atmosférico, não foi detectada atividade do complexo enzimático da nitrogenase no tempo de 0 (início), 8, 16, 24, 40, 48, 72 e 96 horas do processo fermentativo de fécula de mandioca, quando utilizado como substrato dois tipos de fécula com teores de nitrogênio de 0,08 e 0,01%, pH 4,48 e 6,3, e acidez titulável de 3,65 e 1,40 ml de NaOH N/100g de matéria seca. Ficou impossibilitado detectar a existência de discriminação isotópica

de ^{15}N pela atividade biológica de microorganismos fixadores de N_2 atmosférico uma vez que o substrato de fermentação não conteve concentração do elemento nitrogênio suficiente para tornar possível verificar a relação isotópica $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ via espectrometria de massa.

Encontrou-se pouca evidência da existência do mecanismo de fixação biológica de N_2 atmosférico na fase inicial da fermentação natural ou induzida de fécula de mandioca, porém considerando as limitações quanto a alguns aspectos do procedimento metodológico desenvolvido durante o trabalho experimental, não se pode afirmar que tal mecanismo não tenha ocorrido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPE, F. Design and evaluation of a *Lactobacillus manihotivorans* species-specific ribosomal RNA-targeted hybridization probe and its application to the study of sour cassava fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2224-26, 2000.

AMPE, F.; SIRVENT, A.; ZAKHIA, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. **J. Food Microb.** v. 65, p. 45-54, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA. **Dossiê sobre mandioca e seus derivados**. Paranavai, 1999. 26 p.

AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg, 1998. v. 2

BEAUMONT V.I.; JAHNKE, L.L.; MARAIS, D.J.D. Nitrogen isotopic fractionation in the synthesis of photosynthetic pigments in *Rhodobacter capsulatus* and *Anabaena cylindrica*. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 1075-85, 2000.

BEN OMAR, N.; AMPE, F.; RAIMBAULT, M.; GUYOT, J.P.; TAILLIEZ, P. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 285-91, 2000.

BERRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotope by ratio mass spectrometry. In: BOUTON, T.W.; YAMASAKI, S. **Mass spectrometry of soils**. New York:Marcel Dekker. 1996.

BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; URKIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de N associada a plantas utilizando isótopos ¹⁵N. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. **Manual de**

métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Londrina:Embrapa-CNPAF, 1994. p. 471-94.

CARVALHO, E.P. de. **Determinação da microbiótica do polvilho azedo.** 1994. 91f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas.

CAVALLET, L.E.; FERREIRA, D.T.L.; UENO, C.; CEREDA, M.P., NUNES, O. Desenvolvimento de inóculo para padronização da fermentação natural de polvilho azedo. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RAÍCES Y TUBÉRCULOS, 2001, Lima. **Anais...** Lima:C. I. P., 2001.

CEREDA, M.P. **Alguns aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca.** 1973. 89f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CEREDA, M.P. Microorganismos e ácidos orgânicos ocorrentes na fermentação de fécula de mandioca. In: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 361-2, 1975.

CEREDA, M.P.; BONASSI, I.A.; LIMA, V.de A.; WOSIACKI, G. Ensaio de fermentação de fécula de mandioca utilizando substrato esterilizado com brometo de metila. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 1982, Viçosa. **Anais...** Viçosa, 1982.

CEREDA, M.P.; BONASSI, I.A.; BRASIL, O.G.; MATSUI, E. Ensaio de fermentação da fécula de mandioca em diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira da Mandioca**, v. 3, n. 2, p. 69-81, 1984.

CEREDA, M.P.; GIAJ-LEVRA, L.A. Constatação de bactérias não simbióticas fixadoras de nitrogênio em fermentação natural de fécula de mandioca. **Revista Brasileira da Mandioca**, Cruz das Almas, v. 6, n. 1, p. 29-33, 1987.

CEREDA, M.P.; LIMA, U.de A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. II Controle das fermentações realizadas em laboratório. **Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 15, p. 107-22, 1981.

CEREDA M.P.; VILPOUX O.; NUNES O.L.G.da S.; CHUZEL, G. Polvilho Azedo. In: BORZANI. W. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo:Ed. USP, 2001. p. 413-460.

FIGUEROA, C.; DAVILA. A.M.; POURQUIE, J. Latic acid bacteria of the sour cassava starch fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 126-30, 1995.

FRANCO, C.M.L.; TAVARES, D.O. Estudos microbiológicos dos amidos de mandioca natural e fermentados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro:SBCTA, 1998. p. 1289-92.

GUYOT, J.P.; CALDERON, M.; MORLON-GUYOT, J. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 176-82, 1995.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEIN, R.D.; JACKSON, E.K. The acetylene ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiol.**, v. 41, p. 1185-1207, 1968.

HESSELTINE, C.W. A millennium of fungi, food and fermentation. **Mycology**, v. 57, p. 149-97, 1965.

HILL, S. Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In: STACEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H.J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p. 87-134.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo, 1985. 533 p.

LARPENT, J.P.; LARPENT-GOURGAUD, M. **Microbiologia Prática**. São Paulo:Edgard Blucher, 1975. 162p.

LIMMER, C.; DRAKE, H.L. Effects of carbon, nitrogen, and electron acceptor availability on anaerobic N₂-fixation in a beech forest soil. **Soil Biol. Biochem.** v. 30, n. 2, p. 153-58, 1998.

NEVES, M.C.P.; RUMJANECK, N.G. Bioquímica e fisiologia da fixação do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 141-155.

RICKARD, J.E., BEHN, K.R. Evaluation of acid and enzyme hydrolytic methods for determination of cassava starch. **Journal of Science, Food and Agriculture**, v. 4, n. 4, p. 373-79, 1987.

SANTOS, J.E. dos; LACAVA, P.M. Caracterização e estimativa das atividades da nitrogenase "in vitro" de bactérias aeróbias fixadoras de nitrogênio. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 835-8, 1981.

SÃO PAULO. Decreto n^o 12.486, 20 out, 1978. Normas técnicas relativas a alimentos e bebidas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo** – Poder Executivo. n^o 201, p.3-25, publicado em 21/10/78.

SARMENTO, S.B.S.; CEREDA, M.P.; BONASSI, I.; NUNES, O.L.G.S. Caracterização do polvilho azedo comercial produzido no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA MANDIOCA, 1994, Salvador. **Anais...** Salvador:EMBRAPA, 1994. p. 21.

SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R.H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 57, p. 1317-23, 1967.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. Bacillus nitrogen fixers from Brazilian soils. **Plant and Soil**, v. 70, p. 243-55, 1983.

ULLOA, M.; HERRERA, T.; LANZA G. Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del Pozol. **Ver. Lat-amer. Microbiol.** v. 13, p. 113-24, 1971.

VALADI, H.; VALADI, Å.; LENNART, A.; BLOMBERG, A.; GUSTAFSSON, L. An improved gas distribution system for anaerobic screening of multiple microbial cultures. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, p. 51-7, 2001.

VICTORIA, R.L.; PICOLLO, M.C.; VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 105-119.

WESTBY, A.; CEREDA, M.P. Production of fermented cassava starch (polvilho azedo) in Brazil. **Trop. Sci.**, v. 34, p. 203-10, 1994.

YONEYAMA, T. Characterization of natural ¹⁵N abundance of soils. In: BOUTTON, T.H.; YAMASAKI, S. **Mass Spectrometry of Soils**, 1996. p. 225-46.

ZAKHIA, N.; DUFOUR, D.; CHUZEL, G.; GRIFFON, D. Review of sour cassava starch production in rural Colombian areas. **Trop. Sci.**, v. 36, p. 247-55, 1996.