



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

FRANCISCO FÁBIO CAVALCANTE BARROS
Engenheiro de Alimentos, Mestre em Ciência de Alimentos

**OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA, ENZIMAS E
BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis*
EM MANIPUEIRA**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Profª Drª GLÁUCIA MARIA PASTORE
Orientadora

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação ou tese
OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA, ENZIMAS E
BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* EM
MANIPUEIRA defendida por FRANCISCO FÁBIO CAVALCANTE
BARROS, aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____ e
orientado pela Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA PASTORE.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

B278o Barros, Francisco Fábio Cavalcante
Obtenção de compostos de aroma, enzimas e
biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em
manipueira / Francisco Fábio Cavalcante Barros. --
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biotecnologia. 2. *Bacillus subtilis*. 3.
Manipueira. 4. Fermentação. 5. Biomoléculas. I.
Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production of aroma compounds, enzymes, and
biosurfactants by *Bacillus subtilis* in manipueira

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Biotecnology

Bacillus subtilis

Cassava wastewater

Fermentation

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Ana Paula Dionísio

Gabriela Alves Macedo

Janaína Nicanuzia dos Prazeres

Stanislau Bogusz Júnior

Data da defesa: 26/08/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Tese de Doutorado aprovada e defendida em _____ de _____ de 2011, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
DCA/FEA/Unicamp
Orientadora

Dra. Ana Paula Dionísio
CNPAT/Embrapa

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
DCA/FEA/Unicamp

Dra. Janaína Nicanuzia dos Prazeres
IQ/USP

Dr. Stanislaw Bogusz Júnior
IQ/Unicamp

Profa. Dra. Denise Maria de Guimarães Freire
IQ/UFRJ

Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo
DEQ/UFRN

Profa. Dr. Juliano Lemos Bicas
CAP/UFSJ

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

Frase atribuída a Aristóteles

“E andavam para o Sul, metidos naquele sonho. Uma cidade grande, cheia de pessoas fortes. Os meninos em escolas, aprendendo coisas difíceis e necessárias. Eles dois velhinhos, acabando-se como uns cachorros, inúteis, acabando-se como Baleia. Que iriam fazer? Retardaram-se temerosos. Chegariam a uma terra desconhecida e civilizada, ficariam presos nela. E o sertão continuaria a mandar gente para lá. O sertão mandaria para a cidade homens fortes, brutos, como Fabiano, Sinhá Vitória e os dois meninos.”

Graciliano Ramos

“Num deserto de almas também desertas, uma alma especial reconhece de imediato a outra.”

Caio Fernando de Abreu

A meus pais e professores.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a todos que ajudaram direta ou indiretamente em algum momento na execução deste trabalho:

Profa. Gláucia Pastore, Ana Paula Simiqueli, Cristiano Andrade, Stanislaw Bogusz, Daniele Carvalho, além de todos os colegas dos Laboratórios de Bioraomas (FEA), Bioquímica (FEA), Engenharia de Bioprocessos (FEA), Biosseparação (FEQ) e Análise de Alimentos (FEA).

Aos membros da banca de qualificação e defesa:

Prof. César Santana, Prof. Ranulfo Monte Alegre, Profa. Gorete Ribeiro, Profa. Denise Freire, Profa. Gabriela Macedo, Profa. Janaína Prazeres, Prof. Juliano Bicas, Dr. Stanislaw Bogusz e Dra. Ana Paula Dionísio

Aos amigos e incentivadores de sempre:

Ana Paula Dionísio, Juliano Bicas, Júnio Silva, Cedenir Quadros, Mário Mano, Ana Paula Simiqueli, Cristiano Andrade, Stanislaw Bogusz, Angélica Neri-Numa, Daniele Carvalho, Roger Wagner, Gustavo Molina, Lísia Huber, Maurício Amorim, Cíntia Kobori, Conceição Castro, Raquel Abreu, Júnior Maia, Evânia Figueiredo, Josineide Reis, Bernardo Yépez e Luciano Leal, Vânio Miranda e Ricardo Ongaratto.

E aos meus pais, Celeste e José (Josa), e Irmãos, Fernando, Maria (Ciada), Flávio, Rosana e seu esposo Clodomiro, Erasmo e Neto, sem os quais não teria chegado até aqui.

Sumário

Resumo Geral	1
Abstract	2
Apresentação	3
Objetivos Gerais.....	5

Capítulo 1: Os bioprocessos como ferramenta para a sustentabilidade ambiental e econômica da agroindústria	6
---	---

Resumo	6
1. Introdução	7
2. Química verde	9
3. Resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos	10
4. Resíduos agroindustriais como meios de cultura	14
5. Produção biotecnológica integrada	16
5.1 Biorrefinaria.....	16
5.2 Coprodução	19
6. Conclusão	22
7. Referências Bibliográficas	23

Capítulo 2: Produção de biossurfactantes em manipueira I: influência do período de colheita da mandioca e da diluição da manipueira	29
--	----

Resumo	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos.....	31
2.1. Coleta das amostras	31
2.2. Tratamento do substrato	31
2.3. Preparo do inóculo e fermentação	32

2.4. Análises	33
2.5. Tratamento estatístico.....	34
2.6. Condições climáticas	34
3. Resultados e Discussão	34
3.1. Composição da manipueira e dados climatológicos	34
3.2. Produção de biossurfactante	40
3.3. Análise de correlação entre composição da manipueira e a produção de biossurfactante.....	44
4. Conclusão	45
5. Referências Bibliográficas	46

Capítulo 3: Produção de biossurfactantes em manipueira II: influência do período de colheita da mandioca no processo em biorreator.....	49
--	----

Resumo	49
1. Introdução	49
2. Materiais e Métodos	50
2.1. Coleta das amostras	50
2.2. Tratamento do substrato	51
2.3. Fermentações	51
2.4. Purificação do biossurfactante	52
2.5. Análises	53
2.6. Tratamento estatístico.....	54
3. Resultados e Discussão	55
3.1. Variação na composição e pH da manipueira.....	55
3.2. Cinética do processo.....	56
3.3. Cinética do processo e produção de biossurfactante.....	61
3.4. Análise de correlação entre composição da manipueira e volume de espuma	68
4. Conclusão	69
5. Referências Bibliográficas	69

Capítulo 4: Produção de enzimas de interesse industrial por linhagens de *Bacillus subtilis* produtoras de biossurfactante72

Resumo	72
1. Introdução	72
2. Material e Métodos.....	74
2.1. Micro-organismos e preparo do inóculo	74
2.2 Meios de cultura.....	75
2.3 Seleção de culturas em meio sólido	76
2.4 Processo fermentativo em meio líquido	77
2.5 Amostragem nos experimentos em meio líquido	77
2.6 Medida de atividade enzimática.....	77
3. Resultados e discussão.....	79
3.1 Seleção de culturas em meio sólido	79
3.2 Atividade enzimática em meio líquido sintético	83
3.3 Atividade Enzimática em Manipueira	86
4. Conclusão	90
5. Referências Bibliográficas	91

Capítulo 5: Produção de Diacetil e Acetoína por *Bacillus subtilis* em manipueira ..94

Resumo	94
1. Introdução	94
2. Material e Métodos.....	96
2.1. Substrato.....	96
2.2. Preparo do inóculo	97
2.3. Processo fermentativo em batelada e amostragem	97
2.4. Processo fermentativo em batelada alimentada	98
2.5. Quantificação e identificação dos voláteis	99
3. Resultados e discussão.....	99

3.1. Voláteis da manipueira tratada	99
3.2 Voláteis produzidos e sua cinética durante a fermentação em batelada	101
3.3 Cinética de produção de voláteis em fermentação em batelada alimentada	104
4. Conclusão	106
5. Referências Bibliográficas	106

Capítulo 6: Coprodução de enzimas, aromas e biossurfactantes por *Bacillus subtilis* em manipueira..... 110

1. Introdução	110
2. Material e métodos	111
2.1. Coleta das amostras e tratamento do substrato	111
2.2. Preparo do inóculo	112
2.3. Aparatos de fermentação	112
2.4. Processo fermentativo e amostragem.....	113
2.5. Purificação do biossurfactante	114
2.6. Análises	114
3. Resultados e discussão.....	116
3.1. Dados gerais da cinética da fermentação	117
3.2. Produção de biossurfactante	119
3.3. Compostos voláteis	120
3.4. Atividade enzimática	121
4. Conclusão	123
5. Referências Bibliográficas	124
Considerações finais	128

Índice de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Datas de coleta da manipueira e teor de nitrogênio total na manipueira tratada.	38
Tabela 2. Concentração de micronutrientes (grupos 1, 2 e 3) e valores de pH para manipueira tratada coletada em diferentes períodos.	40
Tabela 3. Média dos resultados de atividade superficial (TS, CMD^{-1} e CMD^{-2} expressos em $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) nas diferentes diluições de manipueira incluindo resultados para o teste de Siegel-Tukey na comparação entre soluções para um mesmo mês.	41

Capítulo 3

Tabela 1. Períodos das coletas da manipueira e respectivas numeração das amostras, valores de pH e concentração de fontes de carbono e nitrogênio.	56
Tabela 2. Dados de atividade superficial para a espuma clarificada coletada em diferentes tempos de fermentação de amostras de manipueira coletada em diferentes períodos	65

Capítulo 5

Tabela 1. Principais compostos voláteis avaliados por HD-SPME, GC-MS e GC-FID dentre os produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> LB5a em manipueira.	100
--	-----

Índice de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1.** Esquema básico de uma biorrefinaria. As substâncias básicas são produzidas via fracionamento resultando em uma árvore de produtos industrialmente relevantes 17

Capítulo 2

- Figura 1.** Concentração de açúcares totais e redutores nas amostras de manipueira tratada coletadas em diferentes meses. 35
- Figura 2.** Monitoramento Climatológico do município de Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, Brasil, no período de 01/01/2008 até 10/04/2009 (CIAGRO, 2010). 36
- Figura 3.** Valores de amônio e nitrato (em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) nas amostras de manipueira tratada coletada em diferentes meses. 39
- Figuras 4a e 4b.** Análise estatística (Tukey) dos resultados de CMD^{-2} expressos em $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ nas diferentes diluições de manipueira incluindo resultados para o teste de Siegel-Tukey na comparação entre os mesmos valores de diluição para meses diferentes. 42

Capítulo 3

- Figura 1.** Contagem de células viáveis de *Bacillus subtilis* no meio de cultura por tempo de fermentação. 58
- Figuras 2a e 2b.** pH do meio de cultura (a) e da espuma (b) em diferentes fermentações de diferentes amostras. 59
- Figura 3.** Tensão superficial do meio de fermentação em função do tempo de fermentação 60
- Figura 4.** Cinética de produção de espuma obtida nas fermentações por 62

Bacillus subtilis das amostras de manipueira coletada em diferentes meses.

Figura 5. Volume total de espuma obtido nas fermentações em diferentes amostras. 63

Figura 6. Médias da diluição micelar crítica CMD^{-2} para as espumas clarificadas de diferentes tempos de fermentação realizadas em diferentes amostras de manipueira. 67

Capítulo 4

Figura 1. Diâmetro médio dos halos nas placas indicadoras de lipase para cada linhagem de *Bacillus subtilis*. 80

Figura 2. Diâmetro médio dos halos nas placas indicadoras de protease para cada linhagem de *Bacillus subtilis*. 81

Figura 3. Diâmetro do halo nas placas indicadoras de amilase para cada linhagem de *Bacillus subtilis*. 82

Figura 4a e 4b. Placas de ágar leite com 24 h (a) e 72 h (b) para as linhagens LB 117 e LB1a (a) e LB5a e ATCC21332 (b) no quais os halos de proteólise são evidentes. 82

Figura 5. Cinética de atividade amilolítica das linhagens LB5a e LB1a crescidas em meio sintético suplementado com amido de mandioca 1% (p/v). 83

Figura 6. Cinética de atividade proteolítica das linhagens LB5a e LB1a crescidas em meio sintético cuja fonte de carbono foi glicose 1% (p/v). 85

Figura 7. Cinética de atividade lipolítica das linhagens LB5a e LB1a de *Bacillus subtilis* crescidas em meio sintético suplementado com azeite de oliva 1% (p/v). 86

Figura 8. Cinética de atividade amilolítica das linhagens LB5a e LB1a de *Bacillus subtilis* crescidas em manipueira tratada. 88

Figura 9. Cinética de atividade proteolítica das linhagens LB5a e LB1a de *Bacillus subtilis* crescidas em manipueira tratada. 89

Figura 10. Cinética de atividade lipolítica das linhagens LB5a e LB1a de <i>Bacillus subtilis</i> crescidas em manipueira tratada.	90
---	----

Capítulo 5

Figura 1. Esquema do sistema integrado de fermentação em batelada de manipueira por <i>Bacillus subtilis</i> e aparato de recuperação primária de biossurfactante (adaptado de Barros <i>et al.</i> , 2008) e de amostragem de voláteis (adaptado de Payne <i>et al.</i> , 2002).	98
Figura 2. Cromatograma do extrato capturado através da técnica HD-SPME onde estão destacados os espectros da acetoína (acima) e diacetil (abaixo) em manipueira fermentada por <i>Bacillus subtilis</i> LB5a.	101
Figura 3. Estimativas de concentração de acetoína, diacetil, média açúcares totais e média de contagem de unidades formadoras de colônia ao longo do processo fermentativo em batelada realizado por <i>Bacillus subtilis</i> LB5a em manipueira.	102
Figura 4. Comparação entre de concentração de acetoína longo do processo fermentativo em batelada e em batelada alimentada (a partir de 20 horas) realizado por <i>Bacillus subtilis</i> LB5a em manipueira.	105

Capítulo 6

Figura 1. Esquema do sistema integrado de fermentação em batelada de manipueira por <i>Bacillus subtilis</i> e aparatos de amostragem de meio fermentado e de recuperação primária de biossurfactante (adaptado de Barros <i>et al.</i> , 2008) e de amostragem de voláteis (adaptado de Payne <i>et al.</i> , 2002).	113
Figura 2: Cinética da contagem de células viáveis, tensão superficial e pH da manipueira fermentada por <i>Bacillus subtilis</i> .	118
Figura 3: Cinética de volume de espuma de espuma recolhida, biossurfactante semipurificado e concentração de biossurfactante	119

semipurificado por mililitro de espuma coletada.

Figura 4. Cinética das médias das áreas dos picos de acetoína e diacetil do processo de fermentação da manipueira por *Bacillus subtilis*. 121

Figura 5. Cinética de atividade (U) amilolítica, lipolítica e proteolítica do meio de cultura centrifugado durante o processo de fermentação da manipueira por *Bacillus subtilis*. 122

Resumo Geral

Um notável desenvolvimento dos bioprocessos tem sido alcançado nas últimas décadas. Entre os principais objetivos da aplicação desses processos está a obtenção de compostos de elevado valor agregado. Somado a isso há, atualmente, uma crescente demanda por materiais e energia, fato que resulta em desequilíbrios ambientais, especialmente quando esses bens são produzidos a partir de fontes não renováveis como o petróleo, por exemplo. Entre as diferentes estratégias para o desenvolvimento desses bioprocessos estão a coprodução, onde a partir de um mesmo processo são obtidos mais de um produto simultaneamente, e o uso resíduo e subprodutos agroindustriais como meios de cultura ou substrato de reações bioquímicas. Neste trabalho, foi realizado o estudo do processo fermentativo realizado pela bactéria *Bacillus subtilis* usando como meio de cultura a manipueira, um resíduo da industrialização de mandioca. Esse processo resultou na produção simultânea de biomoléculas de interesse industrial, no caso: lipopeptídios biossurfactantes, os compostos voláteis acetoína e diacetil e as enzimas do grupo das amilases e proteases. Adicionalmente, foi usado o método previamente descrito na literatura de recuperação primária de biossurfactantes baseado nos princípios da coluna de espuma. Esse procedimento possibilitou o arraste dos bioprodutos sem que fosse necessário o uso de compostos sintéticos, como solventes, ou a modificação dos parâmetros de fermentação.

Abstract

A notable bioprocesses development was achieved in recent decades. Among the objectives of these processes is the production of high added value compounds. Moreover, there is a growing demand for materials and energy, which results in negative environmental issues, especially when those supplies are produced from non-renewable sources such as petroleum. Some of these different strategies for the bioprocesses development are co-production and the use of agro-industrial waste and by-products. The aim of this work was to study the fermentation process carried out by the bacterium *Bacillus subtilis* developed in manipueira that is a residue of the cassava industrialization. This process resulted in the simultaneous production of industrial interest biomolecules: lipopeptide biosurfactants, volatile compounds (acetoin and diacetyl), and enzymes (amylases and proteases). It was used the primary recovery method of biosurfactants based on the principles of the column of foam. This procedure enabled the drag of bioproducts without the use of synthetic chemicals such as solvents, or modification of the fermentation parameters.

Apresentação

O desenvolvimento de processos fermentativos viáveis é, certamente, uma das bases da biotecnologia industrial. Do mesmo modo, as vias bioquímicas são processos chave para o desenvolvimento da “química verde”. Esses “novos” modos de produção de materiais e energia não são um fim em si, mas parte de um conjunto de estratégias e técnicas que visam um desenvolvimento de processos e matérias-primas industriais independente de fontes finitas, ecologicamente corretos, socialmente responsáveis e economicamente viáveis. Essas necessidades se impõem por diversos motivos que vão dos intrinsecamente financeiros às questões geopolíticas, assim como as questões ambientais que vem se tornando cada vez mais importantes.

Este trabalho se encaixa nesse contexto em três pontos específicos:

- O uso de resíduos agroindustriais - mais especificamente a manipueira, originada na produção de farinha e fécula de mandioca, e que é altamente poluente por sua grande carga de matéria orgânica, especialmente carboidratos;
- O estudo de bioprodutos produzidos por uma mesma espécie microbiana em um mesmo resíduo - no caso, o *Bacillus subtilis*, um dos mais versáteis micro-organismos conhecidos, crescido em manipueira. Os compostos produzidos foram:
 - Biossurfactante (surfactina) já amplamente relatado na literatura para essa combinação microrganismo-substrato;
 - Enzimas (amilases, proteases e lipases) ainda inéditas para essa combinação microrganismo-substrato;
 - Aromas (diacetil e acetoína) ambos ainda inéditos para a combinação em questão.

- O lançamento de bases para um ou vários processos de co-produção de dois ou mais desses bioprodutos em uma mesma fermentação – no caso, qualquer combinação entre os destacados anteriormente.

Em função do exposto, os ganhos decorrentes do desenvolvimento desses processos são óbvios:

- Total adequação ao conceito de reduzir, reciclar e reaproveitar, que é uma das bases da química verde;
- Redução de custos de produção de bioprodutos através do uso de um resíduo de custo teoricamente nulo ou baixo;
- Aprimoramento das informações sobre o processo fermentativo de *Bacillus subtilis* em manipueira, bem como a obtenção de informações básicas para o desenvolvimento de uma possível co-produção.

Objetivos Gerais

Considerando os aspectos acima mencionados, os objetivos do presente trabalho são estudos envolvendo diretamente a fermentação de *Bacillus subtilis* em manipueira sob os seguintes aspectos:

- Variabilidade da composição da manipueira em função da sazonalidade climática anual;
- Influência de diferentes composições da manipueira produzida em uma mesma região sobre a produção de biossurfactante;
- Produção de compostos voláteis de interesse comercial em fermentações em batelada;
- Cinética de atividade enzimática amilolítica, proteolítica e lipolítica extracelular;
- Cinética da produção simultânea das biomoléculas-alvo deste trabalho.

Capítulo 1: Os bioprocessos como ferramenta para a sustentabilidade ambiental e econômica da agroindústria

Resumo

A forte dependência mundial de materiais e energia de base petroquímica é fonte de notórios distúrbios ambientais, políticos e econômicos. Além disso, soma-se ainda o fato de ser insustentável ao longo prazo pela limitação nas reservas, choques cíclicos de preços e por alterações ambientais como o aquecimento global. Alguns conceitos e alternativas têm surgido nas últimas décadas com o objetivo de reduzir essa dependência bem como minorar o impacto ambiental da indústria química, entre esses conceitos estão: a química verde, o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais e a difusão dos processos biotecnológicos, com maior enfoque na subdivisão conhecida como biotecnologia industrial. A consideração de todos esses conceitos leva ao desenvolvimento de outros, como o de biorrefinaria. Nesse conceito, a partir de uma determinada matéria-prima, há a obtenção de um considerável número de produtos diferentes, desse modo, há uma diminuição o volume de resíduos e um aumento do aproveitamento dessas matérias-primas. Do mesmo modo, processos fermentativos no qual há a coprodução de bioprodutos também são vantajosos, desde que a produção de um primeiro composto não prejudique a produção de um segundo ou terceiro. Assim, o conceito de coprodução alinha-se perfeitamente ao conceito de biorrefinaria, especialmente às de via bioquímica, que são aquelas na qual os processos biológicos são usados, tais como processos enzimáticos e fermentativos.

Palavras-chave: Bioprocessos, coprodução, biorrefinarias bioquímicas.

1. Introdução

A mudança da indústria a partir de uma base petroquímica para uma composta por fontes renováveis representa um alargamento das possibilidades de aplicação da biotecnologia industrial. O desenvolvimento de tecnologias inovadoras para processos sustentáveis será necessário para a realização de um salto para a produção de compostos baseados em sistemas biológicos (Hatti-Kaul *et al.*, 2007).

Nossa forte dependência em combustíveis fósseis vem do uso e consumo intensivo de derivados do petróleo. Este fato, combinado ao esgotamento das reservas, causa distúrbios ambientais, econômicos e políticos. Entre os distúrbios ambientais mais discutidos na atualidade está o efeito da atividade humana sobre o clima. Nesse contexto, existem evidências científicas de que a emissão de gases do efeito estufa, tais como dióxido de carbono, metano e óxido nitroso, liberados a partir da combustão de combustíveis fósseis, pelo uso do solo como resultado das atividades humanas e pelos desmatamentos perturba o clima do planeta (Cherubini, 2010; CGEE, 2010). No que diz respeito aos produtos químicos, a dependência em relação aos recursos fósseis são muito fortes. A maior parte dos produtos químicos é derivada de petróleo, sendo aproximadamente 4% da produção mundial destinada para a área de petroquímicos e plásticos (Nossin, 2009). Considerando que onde a demanda mundial por petróleo foi de 84 milhões de barris diários em 2009, com projeção de 99 milhões em 2035 (IEA, 2010), essa porcentagem representa um volume elevado de demanda por essa matéria-prima. Isso contribui com a elevação das cotações do petróleo, o que tem elevado os custos a produção industrial mundial. No entanto, esse encarecimento tem permitido o desenvolvimento de alternativas aos petroquímicos, pois torna as alternativas baseadas em biomassa economicamente competitivas (CGEE, 2010).

Além do aspecto estritamente econômico, o maior apelo por sustentabilidade, tanto por demandas da sociedade como por restrições legais, tem impulsionado o desenvolvimento de alternativas. O próprio termo sustentabilidade necessita de um acordo de definição comum e critérios para sua avaliação. Isso será necessário para a comunicação com as organizações não-governamentais (ONGs), o público em

geral, os reguladores e políticos (Cherubini, 2010), pois qualquer atividade humana produz algum impacto ambiental.

Embora os avanços tecnológicos tenham criado inúmeros problemas ambientais não previstos inicialmente, as descobertas científicas oferecem soluções para muitos desses danos. Deste modo, a inovação é um fator determinante na resposta a esses problemas, pois as tecnologias com um manejo ecologicamente correto permitirão o provimento da sociedade, abrandando, no entanto, efeitos adversos provenientes da pressão antrópica, como: a mudança climática, contaminantes tóxicos e o esgotamento de recursos naturais (Kirchhoff, 2005). Assim, a biotecnologia industrial, ao permitir essa mitigação de danos, já constitui parte definitiva na indústria química, e sua importância crescerá nos próximos anos (Hatti-Kaul *et al.*, 2007). Trata-se, na verdade, do surgimento de um novo setor industrial, o da indústria de bioprodutos, bastante diferente da indústria química clássica existente (CGEE, 2010). Neste aspecto, novas pesquisas e a adoção da tecnologia indicarão quais os novos produtos e processos que contribuirão para o desenvolvimento sustentável em comparação com os sistemas baseados em combustíveis fósseis convencionais (Cherubini, 2010).

A implantação de tecnologias ambientalmente sustentáveis é essencial notadamente quando se considera que a expansão da população global associada a uma elevação dos níveis de qualidade de vida tem um impacto negativo no equilíbrio ambiental (Kirchhoff, 2005). Segundo a Agência de Inteligência Norte Americana, em inglês, *Central Intelligence Agency - CIA*, a população estimada da terra para julho de 2010 era de 6,83 bilhões de habitantes crescendo a uma taxa de, aproximadamente 1,13% ao ano, o que corresponde a um acréscimo populacional de 77 milhões de habitantes anualmente (*Central Intelligence Agency*, 2010). Esse aumento, aliado ao crescimento econômico acelerado nas últimas décadas, elevou significativamente a demanda por bens e serviços que aceleram os problemas relacionados à poluição ambiental bem como a exaustão dos recursos naturais. O quarto relatório de avaliação do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas, em inglês, *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), por exemplo, destacou que o crescimento da população

mundial bem como da demanda per capita de energia estão levando a um rápido aumento na emissão de gases do efeito estufa (GEE) (Cherubini, 2010), especialmente em países não pertencentes à OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, em inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD* (IEA, 2010).

O estabelecimento dessa sociedade ambientalmente sustentável é uma tarefa de grande porte que claramente requer um esforço colaborativo entre a indústria, academia e governo. Essas parcerias maximizarão o uso dos recursos disponíveis, minimizarão o esforço duplicado e acelerarão a adoção de novos produtos e processos menos danosos ao ambiente (Kirchhoff, 2005), embora se saiba que para esse “desenvolvimento sustentável” é importante que os métodos e técnicas usadas para minimizar o impacto ambiental e os produtos finais sejam verdadeiramente verdes e sustentáveis. O uso de matéria-prima sustentável não é suficiente, a proteção ambiental usando tecnologias verdes também é necessária (Cherubini, 2010).

Assim, o objetivo dessa revisão é explicitar de complementaridade entre os diversos conceitos surgidos nas últimas décadas dando enfoque especial ao uso de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos e a coprodução de bioprodutos.

2. Química verde

Entre alguns conceitos de sustentabilidade está o da “química verde”. Este termo foi inicialmente introduzido no início dos anos de 1990 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, em inglês, *Environmental Protection Agency - EPA*, com objetivo de promover tecnologias químicas que reduzissem ou eliminassem o uso ou produção de substâncias perigosas na concepção, manufatura e uso de produtos químicos (Anastas e Warner, 1998; Kirchhoff, 2005; Hatti-Kaul *et al.*, 2007). Esta proposta foi prontamente ampliada para envolver a União internacional da Química Pura e Aplicada, em inglês, *International Union of*

Pure and Applied Chemistry - IUPAC, e a OCDE para que fossem estabelecidas diretrizes para o desenvolvimento mundial dessas tecnologias (CGEE, 2010).

Sua linha mestra baseia-se mais na prevenção do que na correção, conforme os 12 princípios formulados por Paul Anastas e John Warner (Anastas e Warner, 1998), os quais se fundamentam, em linha geral, nos princípios de reduzir, reciclar e reutilizar. Deste modo, a química verde é uma importante ferramenta para alcançar a sustentabilidade ambiental (Anastas e Warner, 1998; Kirchhoff, 2005). Entre as premissas está o fato de que, durante a fabricação e em todo o ciclo de vida dos compostos químicos, a demanda de energia deve ser minimizada, processos seguros devem ser usados, e o uso e produção de compostos químicos perigosos evitados. O produto final deve ser não-tóxico, degradável em moléculas inócuas e com uma produção mínima de resíduos (Anastas e Warner, 1998; Cherubini, 2010). Metodologias e técnicas da química verde podem ser usadas para se alcançar esses objetivos. Por exemplo, o dióxido de carbono supercrítico é reconhecido como um solvente verde, uma vez que não é inflamável, não tóxico, disponível como subproduto de muitas tecnologias de conversão (fermentação de biomassa, por exemplo) e não resulta em resíduos de solventes. Outras tecnologias com grande potencial como métodos energeticamente eficientes são micro-ondas e ultrassons (Gronnow *et al.*, 2005).

3. Resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos

Recentemente, tem sido reconhecida a oportunidade oferecida por uma economia sustentável baseada em recursos renováveis. Nesse contexto, investimentos públicos e privados têm financiado atividades de pesquisa e desenvolvimento nessa área. É cada vez mais aceito globalmente que matérias-primas de origem vegetal como a biomassa, por exemplo, têm potencial para substituir uma grande fração dos recursos fósseis como matérias primas industriais, abordando tanto no setor energético (biocombustíveis) como não energético (produtos químicos e materiais) (Comissão Europeia, 2004).

Este potencial reside no fato de que a biomassa é geralmente composta por resíduos de colheitas ou subprodutos de sua industrialização que são subaproveitados, além de estarem prontamente disponíveis para utilização (CGEE, 2010). Esses materiais renováveis são fornecidos por quatro diferentes setores: agricultura (produtos e resíduos agropecuários); silvicultura (produtos e resíduos florestais); indústria (resíduos e sobras de processos) e aquicultura (algas e microalgas). Uma distinção adicional que pode ser feita dentro de cada um desses setores previamente descritos é em função do tipo de composto orgânico: (i) carboidratos e lignina, e (ii) triacilgliceróis e misturas de resíduos orgânicos (Cherubini, 2010). Diversos fatores são assinalados como decisivos no crescente interesse pela utilização de matérias-primas renováveis. Esses fatores apontam para uma consolidação desse uso no decorrer do século XXI. Podem ser citados como fatores de maior peso: o potencial da biologia industrial, ou *White biotechnology*; as restrições ambientais ao uso de matérias-primas fósseis; a orientação das estratégias empresariais; e as perspectivas da inovação tecnológica como saída de crises (CGEE, 2010).

Além disso, anualmente, em todo o mundo, as indústrias alimentares, agrícolas e florestais produzem milhões de toneladas de resíduos, incluindo bagaços, cascas, polpas, resíduos aquosos, melaços, etc., muitos dos quais representam sérios problemas ambientais com seu descarte. Por outro lado, os custos para o tratamento e eliminação destes são um grande problema financeiro para diversas indústrias (Pandey et. al. 2000a; Makkar e Cameotra, 2002; Couto, 2008). Isso ocorre porque o resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A disposição dos resíduos no meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de energia lançados na atmosfera, nas águas ou no solo deve ocorrer após tratamento que os enquadrem nos padrões estabelecidos na legislação ambiental (Aquarone, 1986; Timofiecsyk e Pawlowsky, 2000). Segundo a legislação brasileira, por exemplo, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento de forma que obedeçam a determinadas condições, padrões e exigências, entre

quais: i) o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor; ii) parâmetros para pH, temperatura, diferença de temperatura entre o efluente e o corpo receptor, materiais sedimentáveis, vazão máxima para lançamento, óleos e graxas (óleos minerais, óleos vegetais e gorduras animais), materiais flutuantes, íons metálicos, fenóis e compostos halogenados; iii) proibição do lançamento de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs); iv) efluentes dispostos no solo, mesmo tratados, não poderão causar poluição ou contaminação das águas e v) proibição de diluição antes do seu lançamento com águas de melhor qualidade. (CONAMA, 2005).

Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. Muitas das técnicas de tratamento de resíduos na verdade, não eliminam os resíduos, mas simplesmente transferem-no de um meio para outro (ar, terra, água), muitas vezes em uma forma altamente diluída (Crittenden e Kolaczekowsky, 1995). Entre as práticas de sustentabilidade da agroindústria está a redução ao máximo possível de perdas bem como na diminuição do volume dos resíduos gerados por esse setor. Assim, há uma grande necessidade de uma melhor gestão destes resíduos, através do conceito: reduzir, reutilizar e reciclar (Makkar e Cameotra, 2002). Este aproveitamento é possível porque esses resíduos podem conter muitas substâncias reutilizáveis de alto valor. Dependendo da existência de uma tecnologia adequada, podem ser convertidos em produtos de valor comercial e matérias-primas para processos secundários, como insumos operacionais ou ingredientes para novos produtos. Numerosas substâncias valiosas na produção de alimentos são adequadas para separação e reciclagem no fim de seus ciclos de vida, apesar do fato desses processos de reaproveitamento não serem totalmente eficientes considerando os custos (Laufenberg *et al.*, 2003).

Deste modo, resíduos sólidos, líquidos e gasosos podem ser minimizados através do seu aproveitamento de duas maneiras: seja com o uso de todos os diferentes componentes da biomassa para a produção de um largo espectro de produtos em um mesmo lugar, ou com a criação de “*bio-clusters*”, nos quais o fluxo de materiais entre as diferentes plantas industriais são promovidas a fim de

transformar um resíduo de uma planta em matérias-primas para outra (Cherubini, 2010). A formação de uma rede de suprimentos está amplamente fundamentada em pesquisas acadêmicas que evidenciam um enorme potencial para aplicação dessa biomassa em diversos campos (CGEE, 2010).

Uma das alternativas recorrentes encontradas na literatura científica para a redução desse problema ambiental e econômico é seu uso em bioprocessos (Timofiecsyk e Pawlowsky, 2000; Pandey, et. al. 2000b; Makkar e Cameotra, 2002; Laufenberg, et al. 2003; Bicas et al., 2010a). Algumas das possibilidades para uso de resíduos vegetais podem ser citadas: (i) Melhoramento dos resíduos para a produção de novos bens; (ii) Bioconversão em novos compostos via fermentação; (iii) Conversão dos resíduos vegetais em suplementos operacionais, como o uso de resíduos como bioadsorvente. As investigações são promissoras no que diz respeito à aplicação futura nos setores acima mencionados, embora não estejam limitadas a essas, e podem, naturalmente ser aplicadas em diversas áreas da produção de alimentos (Laufenberg, et al. 2003). Outros exemplos que podem ser citados são produção de energia obtida através de sua queima (Pandey, et al. 2000b) e produção de insumos agropecuários, como adubo e ração animal (Pandey, et al. 2000a; Cherubini, 2010). A aplicação extensiva desse conceito fornece uma substancial agregação de valor econômico nas cadeias produtivas, além de estimular a produção agrícola e florestal.

O uso de resíduos como substratos alternativos para processos fermentativos só foi possível com o desenvolvimento das áreas de enzimologia e tecnologia das fermentações (Pandey et al., 2000a). Tem sido relatado, nos últimos anos, o desenvolvimento de diversos processos no sentido de um aproveitamento mais eficiente destas matérias-primas para produção de grânéis químicos, bem como de produtos de valor agregado. Entre estes produtos podem ser citados o etanol, biomassa protéica de unicelulares (ou *single cell protein* - SCP), cogumelos, ácidos orgânicos (Pandey et al., 2000a; Couto, 2008), aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, (Pandey, et. al. 2000a; Pandey et al., 2000b), enzimas (Pandey et al., 2000b; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Couto, 2008), biomassa oleaginosa (Menezes, 2000; Wosiacki, 2000) polímeros,

antibióticos (Couto, 2008) biossurfactantes (Barros *et al.*, 2008; Bicas *et al.*, 2010a), aromas (Couto, 2008; Bicas *et al.*, 2010a), oligossacarídeos (Bicas *et al.*, 2010a) bioadsorventes (Laufenberg, *et al.* 2003), entre outros.

4. Resíduos agroindustriais como meios de cultura

Um meio de cultura adequado deve atender às necessidades nutricionais microbianas dando condições para a formação do produto, apresentar preços baixos, além de permitir a prática de um processo mais simples de purificação (Bicas *et al.*, 2010a). Os custos de produção de um meio de cultura possuem significativo impacto na viabilidade de bioprocessos de um modo geral sendo geralmente um gargalo desses, assim, seu sucesso depende do barateamento do processo e da utilização de matérias-primas de baixo custo (Makkar e Cameotra, 2002). Dependendo do processo, os valores dos componentes de um meio podem representar de 38 a 73% do custo total de produção. Assim, uma análise considerando o aspecto econômico na produção do meio de cultura é um elemento chave para fazer um bioprocessos em escala industrial viável e competitivo (Stanbury *et al.*, 1995).

Além de fatores meramente financeiros, outra característica importante está na capacidade que esses meios de cultura têm de prover os nutrientes necessários para um bom desenvolvimento microbiano. A seleção de fontes de carbono e nitrogênio apropriadas bem como de outros nutrientes é um dos estágios mais críticos no desenvolvimento de um processo eficiente e econômico (Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007). Tanto por sua concentração final no meio de cultura, como pelos custos de obtenção, as fontes de carbono orgânico usadas em processos fermentativos podem ser consideradas os principais componentes do custo dessas soluções. Isso torna o uso de resíduos agroindustriais atrativo, pois, devido à sua composição rica em açúcares, nitrogênio e sais minerais e pela facilidade na assimilação microbiana, têm sido considerados apropriados para utilização como matéria-prima para bioprocessos (Konsoula e Liakopoulou-

Kyriakides, 2007; Bicas *et al.*, 2009; Orzua *et al.*, 2009), proporcionando alternativas mais abundantes, baratas e facilmente disponível (Pandey *et al.*, 2000a).

Contudo, algumas limitações são apontadas: variabilidade sazonal, a diferença de técnicas de cultivo, clima, solo ou usos industriais de matérias-primas, etapa do desenvolvimento fisiológico da planta, entre outras, o que pode afetar fortemente a composição dos produtos agrícolas com consequência na composição dos respectivos efluentes (Sagrilo *et al.*, 2002; Aguiar, 2003). Assim, são necessários estudos para avaliar estas variações e seu impacto no rendimento, visto que, um importante estágio é a provisão de matérias-primas renováveis que seja consistente e regular (Cherubini, 2010).

Essas variações naturais de composição dificultam a padronização, sendo muitas vezes necessária a suplementação com nutrientes, além de monitoramento constante, bem como a avaliação dos custos de transporte, armazenagem e tratamento prévio. Além disso, as dificuldades analíticas e metodológicas geram a necessidade de desenvolvimento de metodologias específicas para cada tipo de resíduo utilizado (Mercade e Manresa, 1994). Mesmo assim, a utilização de resíduos pode diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica (Makkar e Cameotra, 2002).

Deste modo, o uso de resíduos agroindustriais representa um excelente campo de possibilidades no desenvolvimento de bioprocessos economicamente viáveis, além de ser uma ferramenta na promoção da sustentabilidade ecológica. No entanto, o progresso tecnológico nessa área não deve ser restrito a uma simples aplicação desses resíduos com até o esgotamento de seus nutrientes, ou algo próximo disso, ou das possibilidades de uso como simples meios de cultura ou suplementos nutricionais. Uma dessas possibilidades é o seu uso em processos que elevem a eficiência da conversão tanto de meios alternativos como dos próprios meios de cultura sintéticos usados na atualidade.

5. Produção biotecnológica integrada

O termo produção biotecnológica integrada pode ter diferentes definições dependendo exatamente do que se está discorrendo, contudo, de modo geral, pode ser definido como o acoplamento de diferentes tarefas que ocorrem simultaneamente em um mesmo processo. Isso pode ocorrer por meio da integração entre produção e recuperação de bioprodutos ou na produção de dois ou mais bioprodutos em um mesmo processo fermentativo, por exemplo, também descrita como coprodução. Este segundo conceito aproxima-se bastante do conceito de biorrefinaria.

5.1 Biorrefinaria

O uso de tecnologias que elevem a eficiência na conversão de matérias-primas em produtos acabados aumenta os benefícios ambientais dos bioprodutos porque a produção de matérias primas é o passo dominante no ciclo de vida dos produtos (Hatti-Kaul *et al.*, 2007). Um conceito destas “tecnologias limpas” é, por exemplo, o de biorrefinarias que trata de uma integração na produção de materiais e energia. Seu objetivo é estabelecer uma produção futura sustentável, que, juntamente com os princípios da química verde e com o uso de tecnologias de baixo impacto ambiental, sejam genuinamente verdes e sustentáveis (Clark, 2009; Cherubini, 2010).

Embora o conceito de biorrefinaria esteja mais voltado para as cadeias produtivas de biocombustíveis (Cherubini, 2010), o conceito mais amplo é perfeitamente aplicável a praticamente todas as áreas da biotecnologia industrial, especialmente considerando as biorrefinarias de rota bioquímica (CGEE, 2010). A dimensão da influência dessa mudança fundamental em matérias-primas industriais sobre a economia é gigantesca. Fontes de carbono fósseis como petróleo e gás natural, devem ser substituídas pela renovável: a biomassa, especialmente a biomassa vegetal (Kamn e Kamn, 2004). Os produtos de uma biorrefinaria devem ser capazes de substituir os produtos baseados em combustíveis fósseis (Cherubini,

2010). Os produtos dessa indústria são chamados de “produtos biobaseados” e “bioenergia”. A tecnologia de base fundamental que será introduzida nas “biorrefinarias”, que, como novas unidades de produção, substituirão as refinarias baseadas em petróleo e terão peso econômico suficiente para gerar uma “bioeconomia” (Kamn e Kamn, 2004). Entre as tecnologias usadas estão as rotas termoquímicas, operacionalmente mais próximas da rota petroquímica convencional, na qual métodos termoquímicos são usados, e as rotas bioquímicas, nas quais essas transformações ocorrem através de processos de biossíntese e biocatálise (CGEE, 2010). O esquema básico de uma biorrefinaria é dado na Figura 1.

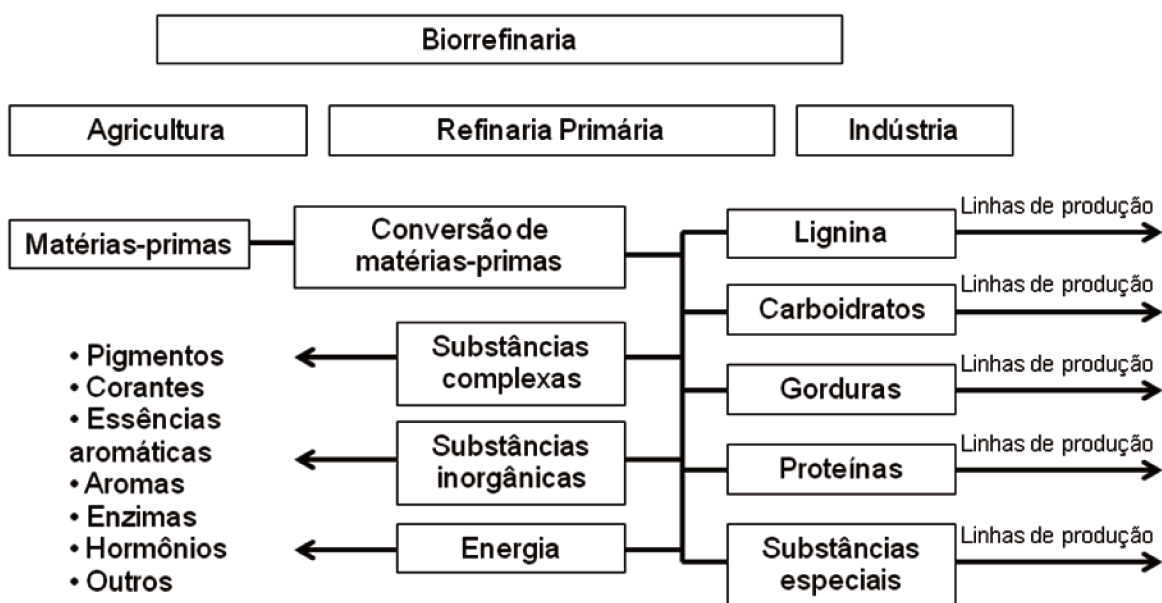


Figura 1. Esquema básico de uma biorrefinaria. As substâncias básicas são produzidas via fracionamento resultando em uma árvore de produtos industrialmente relevantes (adaptado de Kamn e Kamn, 2004).

Mesmo considerando o grande sucesso mundial na pesquisa e desenvolvimento no recente campo das biorrefinarias, este é mais notável na Europa (Kamn *et al.*, 1998; Kamn *et al.*, 2000; Narodoslowsky, 1999). Por outro lado, ao mesmo tempo, há também a promoção de um desenvolvimento industrial significativo nesse setor nos Estados Unidos (U.S. President, 1999; U.S. Congress,

2000), além, é claro, do Brasil, país de matriz energética comparativamente limpa, e que se destaca na produção de biocombustíveis (CGEE, 2010).

Nos Estados Unidos, é esperado que, por volta de 2020, mais de 90% dos compostos químicos orgânicos consumidos sejam baseados na biomassa, o que representa um aumento de 25% na participação do mercado total desses produtos quando comparado ao percentual de 65% atingidos já em 1994. No caso dos combustíveis líquidos, esses valores atingirão mais de 50% do total combustíveis líquidos consumidos pelo país (National Research Council, 2000). O Comitê Consultivo para a Técnica de Biomassa, em inglês, *The Biomass Technical Advisory Committee – BTAC*, dos Estados Unidos, no qual lideranças representativas da indústria, como Dow Chemical, Du Pont, Cargill, Dow LLC, Genecor International, Corn Gowers' Associations e Natural Resources Defense Council estão envolvidos como consultores do governo, têm um plano detalhado para metas em 2030 a respeito de bioenergia, biocombustíveis e bioprodutos (Biomass ReD Technical Advisory Committee 2002; Kam e Kam, 2004).

Além das diretrizes determinadas em função das decisões governamentais, as orientações de estratégias empresariais reforçam o processo de construção de uma indústria baseada em biomassa. Grandes grupos empresariais passaram a instituir planos e metas de avanço nessa área. A Du Pont, por exemplo, estabeleceu princípios de sustentabilidade baseados fortemente na biotecnologia e na utilização de matérias-primas renováveis, enquanto a BASF que passou a identificar a biotecnologia e o uso de matérias-primas renováveis como uma das bases do crescimento. Outros casos podem ser citados como Petrobras, Braskem-Quattor e Oxiten, detentoras de projetos em matérias-primas renováveis, além dessas, iniciativas da Dow, DSM e Novozymes também podem ser destacadas. Finalmente, ao lado das empresas estabelecidas, novas empresas têm surgido atraídas pelas oportunidades da bioenergia, muitas delas com o apoio de investidores de capital de risco (*venture capital*) (CGEE, 2010).

Deste modo a integração de bioprocessos bem como a produção de uma vasta gama de bioprodutos a partir de uma mesma base é uma realidade e uma

oportunidade para o desenvolvimento de tecnologias que aliem a sustentabilidade ambiental e econômica.

5.2 Coprodução

A redução dos custos de produção é um desafio constante para qualquer setor industrial. Entre as estratégias estão: redução do tempo de processo, o uso racional de matérias primas e a exploração completa do processo (Bicas *et al.*, 2010b), além do uso de novas linhagens e técnicas de manipulação genética (Buckland e Lilly, 1993). A coprodução pode ser uma dessas estratégias, pois permite a produção simultânea de mais de um bioproduto numa mesma fermentação. Além da óbvia otimização de recursos que pode representar, poderia haver um direcionamento da produção para um ou outro componente em função da variação de custos ou do valor dos produtos em questão.

A multiplicidade de compostos sintetizados por uma célula viva mesmo em organismos unicelulares é bastante elevada (Buckland e Lilly, 1993). Contudo, em processos fermentativos, essas vias são alteradas visando o favorecimento da produção de determinado composto (Buckland e Lilly, 1993; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Bicas *et al.*, 2010b). Mesmo havendo direcionamento para maximizar a produtividade de determinada substância, as células continuam produzindo a maioria desses compostos caso haja um modo aplicável e economicamente viável, não deixa de ser uma auspiciosa possibilidade. Diversos exemplos de coprodução por via fermentativa de compostos das mais diferentes classes químicas provenientes de um grupo também muito diversificado de micro-organismos foram mostrados, conforme será visto mais adiante. De modo geral, essa técnica pode reduzir custos, pois os gastos referentes aos meios de cultura e energia com a fermentação em si são minimizados, além de ser ambientalmente correta por permitir um melhor aproveitamento das matérias-primas.

Contudo, algumas limitações também são descritas. A tentativa de produção de produtos combinados, por exemplo, pode resultar em baixa produtividade como mostrado por um estudo de Lin *et al.*, (2004) que relatou a produção de S-adenosil-l-

metionina (SAM) e glutathiona reduzida (GSH) por leveduras. Devido à estreita inter-relação de rotas metabólicas de ambos os compostos, foi proposta produção simultânea. Segundo os autores, embora os níveis de produção tenham sido baixos, o processo ainda pode ser considerado viável devido aos baixos custos das leveduras. Um processo alternativo é o cultivo de leveduras selecionadas de elevada produtividade, isso aliado a novas linhagens e processos produtivos (Lin *et al.*, 2004). Em outro trabalho, no qual foi descrita a biotransformação de *R*-(+)-limoneno em *R*-(+)-alfa-terpineol por *Fusarium oxysporum* 152b, associada à produção de lipase, embora a produção máxima de alfa-terpineol foi de 2 g.L⁻¹, 50% a menos que no processo convencional. No entanto, os autores concluíram ser esta uma interessante metodologia sob o ponto de vista industrial que encoraja pesquisas futuras nessa área (Bicas *et al.*, 2010b).

No sentido de conseguir produtividades mais elevadas, bem como um melhor aproveitamento do substrato, uma possibilidade está no consórcio de linhagens microbianas. Em um estudo no qual *Clostridium thermohydrosulfuricum* e *C. thermosulfogenes* produziram etanol e amilases (pululanase e glicoamilase) em meio à base de amido, a combinação de ambas conseguiu aproveitar completamente o amido do meio, fato que não ocorreu isoladamente. Na fermentação com monoculturas, o *C. thermohydrosulfuricum* produziu baixos níveis de pululanase e glicoamilase, enquanto o *C. thermosulfogenes* produziu baixos níveis de beta-amilase e glicoamilase. Em fermentação combinada, houve um aumento do consumo de amido, produção de amilase e formação de etanol. Estes dados mostram que a fermentação em cocultura compreendendo os dois micro-organismos em questão aumenta significativamente a taxa média de conversão de amido em amilases e etanol. Além disso, o etanol e as três enzimas amilolíticas termoestáveis (glicoamilase, pululanase e beta-amilase) foram produzidos em elevadas níveis em um sistema de fermentação de batelada, dados interessantes do ponto de vista industrial (Hyun e Zeikus, 1985).

Outra possibilidade, para o caso de inibição pelo produto, é a retirada dos mesmos durante a fermentação, como apontado na produção de misturas de acetona, butanol e etanol (ABE) usando *Clostridium acetobutylicum* (Maddox *et al.*,

1995). A mistura possui significativo potencial econômico. No entanto, um dos problemas do processo comercial é o fato da produção ser inibida pelos produtos, principalmente o butanol. Assim, em fermentação em batelada, as concentrações de 20 g.L⁻¹ são raramente observadas, o que faz com que sejam necessários grandes reatores. Foi demonstrado que uma maneira de superar este problema seria acompanhar o processo de fermentação contínua a uma técnica de remoção do produto, de modo que a concentração inibitória do produto nunca seja atingida. Isso permitiria o uso de substrato mais concentrado, com uma concomitante redução no tamanho do reator e o aumento da produtividade (Maddox *et al.*, 1995).

Ainda considerando estratégia de viabilização, Martins *et al.*, (2008) relata a coprodução de biossurfactantes e enzimas por *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* sp. em fermentação semi-sólida, com o objetivo de verificar a influência das variáveis no processo fermentativo. Os resultados mostraram que a produção concomitante de lipases e biossurfactantes foi possível em diferentes condições de cultivo. Além disso, a quantidade de lipase produzida não interferiu na produção de biossurfactante, o que pode ser interessante em uma futura aplicação deste meio em uma biorremediação, pois a lipase, que já estaria presente no meio de produção do biossurfactante aceleraria este processo (Martins *et al.*, 2008).

Considerando os ganhos ambientais e econômicos discutidos anteriormente, o uso de resíduos pode ser uma possibilidade, havendo, inclusive, alguns relatos dessa combinação. Os resultados apresentados por Martins *et al.* (2008) apontaram que o uso de resíduos agroindustriais mostrou ser eficiente para a produção de lipase quando comparado aos meios sintéticos, pois os reatores aerados quando utilizados com o meio sintético reduziu a umidade a um nível que prejudicou a produção de lipase. Outro caso é relatado por Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2007) que descreveram a triagem de substratos e meios de cultura alternativos para a coprodução de alfa-amilase e beta-galactosidase termoestáveis por uma linhagem de *B. subtilis*. Os resultados obtidos mostraram um aumento em 1,5 vezes quando o amido solúvel comercial do meio de fermentação foi substituído por produtos agrícolas disponíveis tais como farinhas de milho, trigo ou arroz. Além disso, a substituição da triptona por água de maceração de milho resultou em um

crescimento de 2,5 vezes na produção de beta-galactosidase. Os autores ainda observaram promissora habilidade da linhagem microbiana estudada em produzir significativas quantidades de alfa-amilase e beta-galactosidase quando foi crescida em um meio contendo apenas água de maceração de milho em adição a vários sais inorgânicos (Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

Em um caso específico, esses processos poderiam funcionar como sequestradores de CO₂. Essa possibilidade é descrita em uma fermentação no qual lipídio e biodiesel são produzidos por microalgas e/ou cianobactérias em substratos como vinhaça (caldo fermentado pós-destilação para produção de álcool) e/ou CO₂, originários de destilarias de bioetanol de cana-de-açúcar. A finalidade é a redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e/ou da Demanda Química de Oxigênio (DQO) além do sequestro de CO₂. Neste caso, as algas são cultivadas nesse meio para produção de lipídios que poderiam ser usados na produção de biodiesel ou óleo combustível (Coraucchi-Neto, 2008).

6. Conclusão

Os bioprocessos, em todas as suas variantes, representam uma importante ferramenta no alcance de sistemas industriais que sejam ambientalmente corretos e economicamente sustentáveis. Entre as diversas possibilidades de aplicação desses processos estão: o uso de resíduos agroindustriais a serem utilizados como meio de cultura e fermentação com coprodução. Estando a primeira associada à redução de custos industriais e de mitigação de impactos ambientais e a segunda, por sua vez, alinhada a conceitos como os da química verde e de biorrefinarias. Os estudos nessas áreas, apesar de serem amplos, ainda são insuficientes, o que torna necessários mais estudos para o seu aprimoramento. A importância disso está na grande possibilidade de expansão dessas áreas nos próximos anos em função de demandas não apenas ambientais e econômicas, mas sociais, políticas e estratégicas.

7. Referências Bibliográficas

Aguiar EB, *Produção e Qualidade de Raízes de mandioca de Mesa (Manihot esculenta Crantz) em Diferentes Densidades Populacionais e Épocas de Colheita*. Msc thesis, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, Brazil, PP. 1-90 (2003).

Anastas P and Warner J, *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York, pp. 1-131 (1998).

Aquarone E, Borzani W and Lima UA, *Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial*. v. 2. E. Blücher, São Paulo, pp. 1-231 (1986).

Barros FFC, Ponezi AN and Pastore GM. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1071-1078 (2008).

Bicas JL, Dionísio AP, Silva, JC, Barros FFC and Pastore GM, Agro-industrial residues in biotechnological processes, in *Industrial Fermentation: Food Processes, Nutrient Sources and Production Strategies*, ed. by Krause J and Fleischer O. Nova Science Publishers Inc, Hauppauge, NY, pp. 275-295 (2010)a.

Bicas JL, Quadros CP, Neri-Numa IA and Pastore GM, Integrated process for co-production of alkaline lipase and *R*-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*. *Food Chem* 120:452-456 (2010)b.

Biomass ReD Technical Advisory Committee, *Vision for bioenergy and biobased products in the United States*. http://www.bioproducts-bioenergy.gov/pdfs/BioVision_03_Web.pdf [October 2002].

Buckland BC, Lilly MD, Fermentation: an overview, in *Biotechnology*, ed. Rehm HJ, Reed G, Püler A, Stadler P. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Federal

Republic of Germany) and VCH Publishers Inc., New York, NY (USA), pp 7-22 (1993).

Central Intelligence Agency, The World Factbook. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/xx.html> [4 julho de 2010] ISSN 1553-8133.

CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, *Química verde no Brasil: 2010-2030*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Brasília, PP. 1-432 (2010).

Cherubini F, The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* 51:1412–1421 (2010).

Clark JH, Deswarte FEI, Farmer TJ. The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels Bioprod Bioref* 3:72–90 (2009).

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 53, de 18 de março de 2005, Seção 1, p. 58-63.

Coraucchi-Neto D, Processo tecnológico integrado para produção de lipídios e biodiesel por algas utilizando como substratos vinhaça e/ou CO₂, resíduos das destilarias de álcool (etanol). BR Patent 0705520 (A2) (2008).

Couto, SR. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnol J* 3:859–870 (2008).

Crittenden B, Kolaczowski S, *Waste minimization: a practical guide*. IChemE, England, pp 1-81 (1995).

European Commission – Directorate-General for Research, Towards a European knowledge-based bioeconomy – workshop conclusions on the use of plant biotechnology for the production of industrial biobased products. EUR 21459.

http://ec.europa.eu/research/agriculture/library_en.htm [2004].

Gronnow MJ, White RJ, Clark JH and Macquarrie DJ, Energy efficiency in chemical reactions: a comparative study of different reaction techniques. *Org Process Res Dev* 9:516-8 (2005).

Hatti-Kaul R, Törnvall U, Gustafsson L and Börjesson P, Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol* 25(3):119-124 (2007).

Hyun HH, Zeikus JG, Simultaneous and Enhanced Production of Thermostable Amylases and Ethanol from Starch by Cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl Environm Microbiol* 49:1174-1181 (1985).

International Energy Agency - IEA, *World Energy Outlook 2010 Factsheet - What does the global energy outlook to 2035 look like?* International Energy Agency, Paris pp 1-6 (2010).

Kamm B, Green biorefinery Brandenburg, article to development of products and of technologies and assessment, *Brandenburg Umweltber* 8:260-269 (2000).

Kamn B and Kamn M, Principles of biorefineries, *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137-145 (2004).

Kamm B, Kamn M and Soye K, The green biorefinery, concept of technology, in *First international symposium on green biorefinery*, Neuruppin, Germany. Society of Ecological Technology and System Analysis, Berlin, Germany (1998).

Kirchhoff MM, Promoting sustainability through green chemistry. *Resources, Conservation and Recycling* 44:237-243 (2005).

Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M, Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour Technol* 98:150–157 (2007).

Laufenberg G, Transformation of vegetable waste into added products: (a) the upgrading concept; (b) practical implementations. *Bioresour Technol* 87:167-198 (2003).

Lin J-P, Tian J, You J-F, Jin Z-H, Xu Z-N, Cen P-L, An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. *Biochem Eng J.* 21:19–25 (2004).

Maddox IS, Qureshi N, Roberts-Thomson K, Production of Acetone-Butanol-Ethanol from Concentrated Substrates Using *Clostridium acetobutylicum* in an Integrated Fermentation-Product Removal Process. *Process Biochem* 30:209-215 (1995).

Makkar RS and Cameotra SS, An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:428–434 (2002).

Martins VG, Kalil SJ, Costa JAV, Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quim Nova* 31:1942-1947 (2008).

Menezes TJB, Produção de biomassa protéica a partir da manipueira, in *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*, ed. by Cereda MP. Fundação Cargill, São Paulo, pp 118-131 (2000).

Mercade ME, Manresa MA, The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *J Am Oil Chem Soc.* 71:61-64 (1994).

Narodoslawsky M, Green biorefinery, in *Second international symposium on green biorefinery*, Feldbach, Austria. Verein zur Koordination von Forschung über Nachhaltigkeit, Graz, Austria (1999).

National Research Council, *Biobased industrial products, priorities for research and commercialization*. National Academic Press, Washington, D.C. (2000).

Nossin PMM, White biotechnology: replacing black gold? In: Fifth international conference on renewable resources and biorefineries. Ghent, Belgium (2009).

Orzua MC, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, Rodriguez R, Garza H, Teixeira JA and Aguilar CN, Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products* 30:24–27 (2009).

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT, Vandenberghe LPS and Mohan R, Biotechnological potential of agro-industrial residues II: cassava bagasse. *Bioresour Technol* 74:81-87, (2000)a.

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT, Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 74:69-80 (2000)b.

Sagrilo, E., Vidigal-Filho, P.S., Pequeno, M.G., Scarpim, C.A., Gonçalves-Vidigal, M.C., Maia, R., Kvitschal, M.V., 2002. Efeito da época de colheita no crescimento vegetativo, na produtividade e na qualidade de raízes de três cultivares de mandioca. *Bragantia*, 61, 115-125.

Stanburry PF, Whitaker A and Hall SJ, *Principles of Fermentation technology*, 2nd edition. Butterworth Heinemann, Oxford, pp. 93-116 (1995).

Timofiecsyk FR and Pawlowsky U, Minimização de Resíduos na Indústria de Alimentos: Revisão. *B. CEPPA*, 18(2):221-236 (2000).

U.S. Congress, *Biomass research and development act of 2000*. U.S. Congress, Washington, D.C. (2000).

U.S. President, *Developing and promoting biobased products and bioenergy*. Executive order 13101/13134, Clinton WJ. The White House, Washington, D.C. (1999).

Wosiacki G, Fioretto AMC, Almeida MM and Cereda MP, Utilização da manipueira para produção de biomassa, in *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*, ed. by Cereda MP. Fundação Cargill, São Paulo, pp 170-185 (2000).

Capítulo 2: Produção de biossurfactantes em manipueira I: influência do período de colheita da mandioca e da diluição da manipueira

Resumo

Nos últimos anos, houve considerável avanço na aplicação de resíduos agroindustriais como meios de cultura alternativos. No entanto, a variabilidade na composição das matérias-primas de origem vegetal assim como dos efluentes de seu processamento pode, em muitos casos, ser um fator limitante à sua aplicação nos bioprocessos. Neste trabalho, foram coletadas amostras de manipueira resultante da fabricação de farinha de mandioca a partir da variedade IAC-13 cultivada em uma mesma região ao longo de um ano. Nesse período, as amostras foram tratadas e acondicionadas em frascos sendo, em seguida, fermentadas por *Bacillus subtilis*. Após a fermentação foi medida a produção de biossurfactante. Além disso, foi realizado teste de padronização do meio de cultura baseado na concentração de carboidratos por diluição em água. Os resultados mostraram haver influência das condições climáticas sobre a composição da manipueira, especialmente a concentração de açúcares e nitrogênio inorgânico. Essa alteração afeta os níveis de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, especialmente na resposta positiva à elevação na concentração de açúcares que foi de 10,4 g.L⁻¹ a 22,9 g.L⁻¹. De modo geral, a diluição da manipueira em água reduz a produção de biossurfactante, contudo, essa tendência só foi observada a partir de 70% de água no meio, independente da amostra analisada.

Palavras-chave: Manipueira, *Bacillus subtilis*, biossurfactante.

1. Introdução

Os lipopeptídios surfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* estão entre os mais estudados. Isso ocorre devido a sua grande atividade superficial, que propicia uma vasta gama de aplicações (Barros, *et al.*, 2007). No entanto, especialmente em função dos elevados custos de produção, sua aplicação como insumo industrial ainda é limitada (Makkar e Cameotra, 2002; Barros, *et al.*, 2008a). Considerando que as matérias-primas para o preparo do meio de cultura representam um dos principais custos em processos biotecnológicos, sua escolha é de fundamental importância. Para isso, a aplicação de matérias-primas alternativas, como os resíduos agroindustriais, pode ser um importante passo. Além dos evidentes ganhos econômicos, um ganho ambiental também é atingido, visto que ocorreria uma redução no descarte desses resíduos (Makkar e Cameotra, 2002; Bicas *et al.*, 2010).

Em estudos anteriores, a manipueira, que é um resíduo da produção de farinha e fécula de mandioca, foi utilizada como substrato para crescimento de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactantes (Nitschke, 2004; Costa, 2005; Nitschke *et al.*, 2004, Nitschke e Pastore, 2006; Barros, 2007; Barros *et al.*, 2008a). Este resíduo possui grande quantidade de macro e micronutrientes não havendo, assim, necessidade de suplementação do meio de cultura baixando ainda mais o custo de uso nesse processo (Barros *et al.*, 2008a). Contudo, uma das principais limitações do uso desse resíduo é sua sazonalidade, tanto em termos de volume de produção, como pelas características das matérias-primas que podem modificar sensivelmente com a variação climática anual (Aguar, 2003). Isso ocorre porque a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) caracteriza-se por ser uma planta tolerante a condições de seca e baixa fertilidade do solo, sendo este o principal motivo pelo qual é comumente cultivada e consumida por pequenos produtores rurais em áreas com solos pobres e onde as condições climáticas são constantemente desfavoráveis à exploração de outras culturas (Sagrilo *et al.*, 2002). O fornecimento do produto aos mercados é sazonal, concentrando-se nos meses de abril a agosto, período mais frio e seco no Estado de São Paulo. Esta época coincide com o período de repouso

fisiológico das plantas, onde as raízes apresentam os maiores teores de matéria seca e melhor qualidade culinária (Aguiar, 2003).

Sabe-se que a concentração de nutrientes no meio de cultura é uma variável de grande importância na produção de biossurfactantes por *Bacillus*, cuja produtividade tende a cair em valores extremos de alta ou baixa quantidade de fontes de carbono (Sen, 1997), assim como de fontes de nitrogênio (Davis *et al.*, 1999). O objetivo deste trabalho foi estudar do efeito da composição da manipueira e suas flutuações sazonais na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*, dados que se mostram necessários para uma melhor aplicação deste resíduo em processos fermentativos.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras

A manipueira usada nos experimentos foi recolhida em uma fábrica localizada em Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, Brasil, a partir da prensagem de mandioca variedade IAC-13 produzida na região do referido município. O resíduo foi exclusivamente obtido pela prensagem da mandioca lavada, descascada e triturada usada para produção de farinha. A coleta ocorreu durante o período aproximado de 1 ano, entre abril de 2008 e abril de 2009, com um intervalo de 2 a 3 meses entre cada coleta, totalizando 6 coletas (tabela 1, em Resultados e Discussão). Para isso, a manipueira recém extraída foi acondicionada sob refrigeração e encaminhada para câmara frigorífica onde permaneceu armazenada a -18°C para posterior uso.

2.2. Tratamento do substrato

O substrato foi descongelado, aquecido até fervura, resfriado a 5°C e centrifugado na mesma temperatura a $1,6 \cdot 10^3$ g por 20 minutos. Essa etapa do processo teve como objetivo a solubilização do amido, a decantação de sólidos suspensos e a eliminação do ácido cianídrico. Após esse processo, o produto

resultante foi chamado de manipueira tratada. Em seguida, procedeu-se a diluição do substrato em água destilada a diferentes concentrações de 5, 10, 30, 50, 70, 80 e 90% (v:v) de manipueira além do efluente puro (100%). As soluções foram distribuídas em porções de 30mL em frascos Erlenmeyer e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata para cada amostra.

2.3. Preparo do inóculo e fermentação

Para os experimentos, foi usada uma cultura de *Bacillus subtilis* identificada como LB5a pertencente à coleção do Laboratório de Bioaromas (DCA/FEA/UNICAMP) (Nitschke, 2004; Costa, 2005; Nitschke *et al.*, 2004, Nitschke e Pastore, 2006; Barros, 2007; Barros *et al.*, 2008a). O inóculo foi preparado a partir de colônias crescidas por 24 horas em placas de Ágar Nutriente a 30°C. Após crescimento, uma alçada das colônias foi transferida para frasco contendo Caldo Nutriente onde foi incubado a 30°C sob agitação de 150rpm por 24 horas. Após incubação, foi realizada a leitura de densidade ótica na faixa de 660 nm para padronização do inóculo com meio de cultura estéril. Utilizou-se um inóculo com absorbância de 0,5, o que representou em análises microbiológicas realizadas concomitantemente, uma concentração de aproximadamente $3 \cdot 10^8$ UFC·mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado em todos os experimentos deste trabalho.

A fermentação foi realizada em frascos de vidro de 250 mL com 50 mL de manipueira tratada adicionada de 1mL do inóculo descrito anteriormente e incubado a 30°C sob agitação de 150rpm por 48 horas. Após a fermentação, o meio foi centrifugado a $1,6 \cdot 10^3$ g por 10 minutos para eliminação de células para posteriores análises.

2.4. Análises

2.4.1. Caracterização do substrato

Foram realizadas análises de carboidratos totais e açúcares redutores. Além disso, os teores de Al, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn foram realizados por extração nítrico-perclórico e determinados por ICP-OES (Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) com extração ácida nítrico-perclórica. O nitrogênio total foi determinado através do método de Kjeldahl (Bremner e Mulvaney, 1982). As determinações dos íons amônio (NH_4^+) e íon nitrato (NO_3^-) foram realizadas por destilação (Bremner e Mulvaney, 1982).

2.4.2. Atividade superficial

Os meios de cultura fermentados foram previamente clarificados por centrifugação a $1,6 \cdot 10^3 \text{g}$ por 10 minutos. Em seguida, foram realizadas medidas de tensão superficial (TS) do sobrenadante e de suas diluições em água destilada nas seguintes proporções: 1:10 ou diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}), e 1:100 ou diluição micelar crítica 1/100, (CMD^{-2}) (Barros *et al.*, 2008b). Todas as medições foram feitas em tensiômetro modelo K12 (A. KRÜSS Optronic GmbH, Alemanha) usando o método da placa (Barros *et al.*, 2008b) em 10 repetições até desvio padrão de 0,2.

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) foi realizada através da medida da tensão superficial de diluições seriadas de uma solução de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ do biossurfactante semipurificado conforme descrito por Barros *et al.* (2008b). Em seguida, foi identificado o ponto de inflexão da curva de tensão superficial *versus* concentração do biossurfactante de acordo com Sheppard e Mulligan (1987) e Barros *et al.* (2008b).

2.5. Tratamento estatístico

Na avaliação dos resultados da fermentação, as respostas obtidas para a atividade superficial foram analisadas quanto à diferença significativa ao nível de 5%, utilizando o método de Siegel-Tukey. Foi analisado se as diferenças encontradas eram significativas considerando: i) as diferentes concentrações de manipueira usada como substrato procedente de uma mesma coleta; e ii) as diferentes amostras coletadas em meses diferentes para cada tempo e diluição. Também foram realizadas análises de correlação de Pearson para avaliar o nível de correlação entre a composição da manipueira e a produtividade expressa na sua atividade superficial.

2.6. Condições climáticas

Os dados meteorológicos da região produtora de mandioca foram consultados a partir da base de dados disponível no sítio do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIAGRO, 2010) que, por sua vez, são oriundos de medições realizadas em estação meteorológica localizada em Santa Maria da Serra, estado de São Paulo. O período considerado para o levantamento de dados foi de 1º de janeiro de 2008 a 10 de abril de 2009.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição da manipueira e dados climatológicos

Sabe-se que as principais fontes de carbono na manipueira são o amido, a sacarose e a glicose, havendo também algum teor de frutose (Costa, 2005; Barros *et al.*, 2008a). Já as principais fontes de nitrogênio são os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) (Barros *et al.*, 2008a). É também conhecida a importância das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes por micro-organismos do

gênero *Bacillus* (Barros *et al.*, 2008a). Por esse motivo, esses componentes foram monitorados neste trabalho.

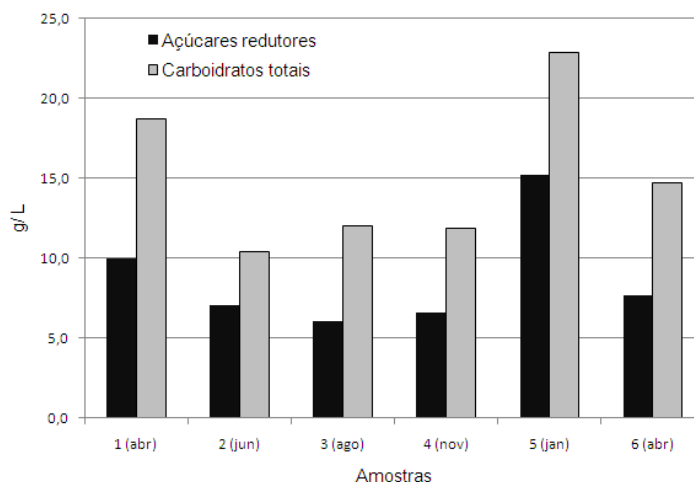


Figura 1. Concentração de açúcares totais e redutores nas amostras de manipueira tratada coletadas em diferentes meses.

Os dados mostrados na figura 1 indicam que os teores de açúcares redutores foram decrescentes a partir da amostra 1 (abril 2008) até atingir um mínimo de 6,1 g.L⁻¹ na amostra 3 (agosto 2009). A partir desse mínimo, os valores foram crescentes até a amostra 5 (janeiro 2009), quando atingiram o máximo em 15,2 g.L⁻¹, quando então voltaram a cair novamente na amostra 6 (abril 2009). A concentração de açúcares totais na manipueira variou de um máximo de 22,9 g.L⁻¹ na amostra 5 (janeiro de 2009) a uma mínima de 10,4 g.L⁻¹ na amostra 2 (abril de 2008). O comportamento da concentração foi semelhante ao de açúcares redutores (figura 1), no qual os valores mínimos foram alcançados nas amostras 2, 3 e 4. Como discutido, tanto os açúcares totais quanto os redutores, apresentaram uma grande variabilidade. O mesmo é descrito na literatura que mostra valores compreendidos entre 34,2 a 58,2 g.L⁻¹ para carboidratos totais e 11,8 a 29,3 g.L⁻¹ para redutores (Nitschcke e Pastore, 2006; Barros, 2007; Barros *et al.*, 2008a), embora não sejam citados os períodos de colheita, a variedade, as condições

climáticas, a densidade de plantio, nem a região geográfica da coleta da mandioca de onde foi extraída a manipueira nos referidos artigos.

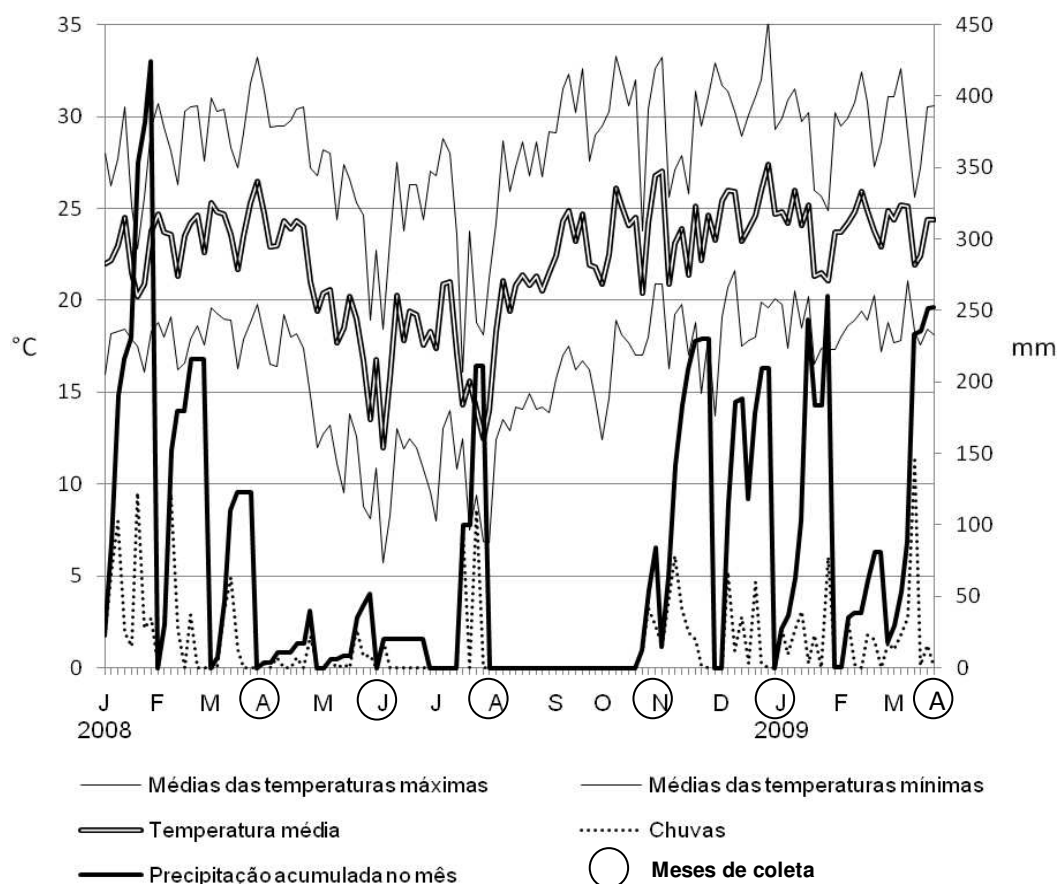


Figura 2. Monitoramento Climatológico do município de Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, Brasil, no período de 01/01/2008 até 10/04/2009 (CIAGRO, 2010). Os meses de coleta estão destacados com um círculo.

Quando comparados os dados climatológicos para pluvimetria acumulada nos meses entre as coletas (figura 2) e os teores de açúcares totais e redutores, foi possível observar uma correlação positiva moderada, de 0,42 e 0,61, respectivamente. Ou seja, parece haver uma relação entre os índices pluviométricos dos meses anteriores à coleta com a concentração de açúcares totais e redutores. Deste modo, quando o índice pluviométrico é maior, o mesmo comportamento acontece na concentração de açúcares. Também foram comparados os teores de

açúcares e a temperatura média nos meses anteriores das coletas (figura 2). Nesse caso, os teores de açúcares totais e redutores, tiveram correlação positiva moderada, de 0,58 e 0,56, respectivamente, quando comparada às temperaturas.

Esses dados estão de acordo com outros trabalhos que avaliaram a influência de fatores climáticos sobre a mandioca (Sagrilo *et al.*, 2002; Aguiar, 2003). Embora em ambos não tenham sido estudados os mesmos componentes por nós estudados, os mesmos avaliaram uma série de indicadores do desenvolvimento fisiológico da planta e suas raízes. No primeiro, em um estudo com mandioca de mesa da variedade IAC 576-70, é relatado que, como consequência das boas precipitações e temperaturas mais elevadas em determinadas épocas do ano, as plantas emitem novas folhas, propiciando o desenvolvimento mais acentuado das raízes (Aguiar, 2003). No segundo, onde foram estudadas as variedades Mico, IAC 13 e IAC 14, observou-se que a produção da parte aérea, compreendida por hastes e folhas, foi favorecida pela elevação da temperatura e da precipitação pluvial. Assim, durante os meses quentes e úmidos, as plantas vegetam abundantemente, sendo o posterior decréscimo na produção da parte aérea resultado da queda das folhas, fenômeno resultante pela redução da temperatura e pela escassez de água disponível (Sagrilo *et al.*, 2002). Assim, os resultados experimentais mostram haver uma redução, durante o período de estiagem, das partes aéreas, especialmente as folhas, com possível redução da taxa de fotossíntese o que, por sua vez, reduz produção de açúcares de baixo peso molecular. Sendo essa a causa mais provável da considerável redução na concentração de açúcares na manipueira.

Quanto à presença de fontes de nitrogênio, foram monitorados o nitrogênio total, e os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) (tabela 1 e figura 2). Quando considerado os valores de N total, não houve uma tendência definida, sendo que esses variaram entre 0,4 e 1,0 g/kg (tabela 1). Quanto aos teores do íon amônio, houve uma tendência de elevação na concentração nas amostras no período compreendido entre as amostras 2 (junho de 2008) e amostra 4 (novembro de 2008), atingindo valor máximo de 105 mg.L^{-1} na amostra 3 (agosto de 2008). Os valores de nitrato não apresentaram uma tendência muito bem definida, oscilando de valores de 32 a 69 mg.L^{-1} .

Tabela 1. Datas de coleta da manipueira e teor de nitrogênio total na manipueira tratada.

Amostra	Data	N total (g.kg ⁻¹)
1	Abril/2008	0,6
2	Junho/2008	0,8
3	Agosto/2008	1,0
4	Novembro/2008	0,4
5	Janeiro/2009	0,4
6	Abril/2009	1,0

Quando comparados os dados climatológicos para temperatura média nos meses entre as coletas e os teores dos íons amônio e nitrato (figura 3), foi possível observar uma forte correlação negativa, de -0,94 e -0,73, respectivamente. Ou seja, parece haver uma relação entre a temperatura média dos meses anteriores da coleta com a concentração dos íons amônio e nitrato. Assim, quando a temperatura foi maior, menor foi a concentração desses íons, o que sugere forte comportamento antagônico. Os mesmos íons foram também comparados aos dados climatológicos para pluviometria acumulada nos meses entre as coletas (figura 2). Nesse caso, os teores apresentaram correlação negativa moderada de -0,53 para amônio e uma fraca correlação negativa de -0,05 para nitrato. Portanto, não parece haver uma relação entre pluviometria e estes íons, talvez a correlação moderada para o amônio seja apenas um reflexo da elevação temperatura, já que estes dois fatores são razoavelmente simultâneos para a região pesquisada.

Para avaliação da composição de micronutrientes, os respectivos resultados foram classificados em três grupos: (1) o primeiro com apenas o Alumínio, onde os valores encontrados foram muito baixos ($<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$), estando abaixo da linha de detecção do método para todas as amostras; (2) o segundo para aqueles com valores inferiores a 1 mg.L^{-1} , onde se encaixaram P, Ca, Mg, S, B e Cu; e (3) o terceiro grupo com os componentes cujas concentrações foram, em média, superior a 1 mg.L^{-1} , onde se encontram K, Fe, Mn e Zn (tabela 2). Adicionalmente, são expressos os valores de pH das amostras.

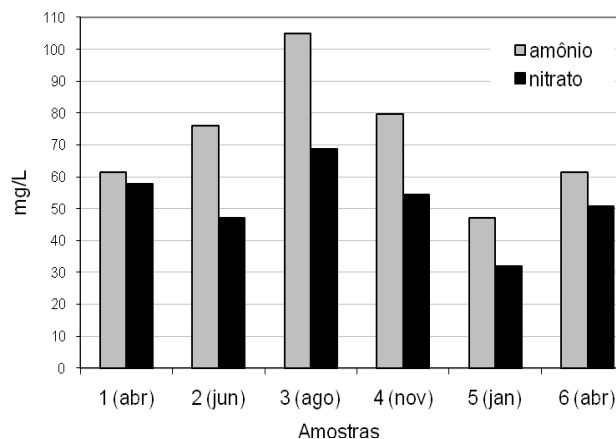


Figura 3. Valores de amônio e nitrato (em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) nas amostras de manipueira tratada coletada em diferentes meses.

Embora os valores de micronutrientes do grupo 2 tenham variado, os mesmos não apresentaram tendência ao longo do período, ocorrendo apenas uma flutuação em torno de determinados valores para cada componente. Exceção ocorre apenas para a amostra 4, onde os valores foram sistematicamente menores para todos os minerais analisados. O comportamento do grupo 3 apresentou perfil diversificado quando comparados entre si. Por outro lado, a variação dos teores de K, Mn e Zn foi bastante considerável, chegando, em alguns casos, a uma diferença superior a duas vezes a concentração mínima. Além disso, essas alterações foram aleatórias não sendo observada qualquer tendência. O mesmo não foi evidenciado para o Fe, que manteve valores sempre entre 2,0 e 2,8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Sabe-se que a composição mineral de vegetais está estreitamente ligada à composição mineral do solo onde estes são cultivados (Marschner, 1995), esse fenômeno certamente foi o promotor de tais diferenças de concentração, pois embora a manipueira tenha sido colhida em uma mesma região geográfica não foi necessariamente do mesmo campo.

Tabela 2. Concentração de micronutrientes (grupos 1, 2 e 3) e valores de pH para manipueira tratada coletada em diferentes períodos.

Grupo	pH	1 (mg.L ⁻¹)	2 (mg.L ⁻¹)						3 (mg.L ⁻¹)			
Elemento Amostra		Al	P	Ca	Mg	S	B	Cu	K	Fe	Mn	Zn
1 (abr)	5,7	< 0,01	0,2	0,5	0,7	0,1	0,5	0,7	4,0	2,8	6,5	1,6
2 (jun)	5,7	< 0,01	0,2	0,3	0,5	0,1	< 0,01	0,3	2,5	2,2	1,8	0,0
3 (ago)	5,9	< 0,01	0,4	0,5	0,8	0,2	0,3	0,8	4,0	2,1	3,3	1,6
4 (nov)	5,6	< 0,01	0,1	0,1	0,2	< 0,01	< 0,01	0,1	1,3	2,5	1,2	0,9
5 (dez)	5,3	< 0,01	0,2	0,3	0,6	0,1	< 0,01	0,2	2,9	2,8	2,8	1,0
6 (abr)	5,6	< 0,01	0,4	0,3	0,7	0,1	< 0,01	0,4	3,1	2,0	1,6	0,2

3.2. Produção de biossurfactante

Para a mensuração da produção de biossurfactante foi considerado que quanto menor fosse qualquer dos valores de TS, CMD⁻¹ ou CMD⁻², maior seria a produção de biossurfactante (Nitschke *et al.*, 2004). Neste experimento foram feitas comparações de dois tipos: (i) entre os resultados obtidos em fermentados de meios de cultura com diferentes concentrações de manipueira de uma mesma amostra (tabela 3); e (ii) entre os resultados obtidos em fermentados de meios de cultura de mesmas concentrações, contudo de manipueira de amostras diferentes coletadas nos diferentes períodos ao longo do ano (figuras 4a e 4b).

Avaliando os dados contidos na Tabela 3 é possível observar que a TS para todas as amostras analisadas aproximou-se de 27 mN.m⁻¹, o que demonstra o crescimento microbiano acompanhado pela produção de biossurfactantes em níveis superiores ou próximos à CMC. Isso faz com que seja difícil uma comparação usando este parâmetro, pois para os surfactantes, à medida que a concentração do composto aproxima-se ou é superior à CMC, não há praticamente variação na tensão superficial (Sheppard e Mulligan, 1987; Barros *et al.*, 2008b), ou seja, esse parâmetro é um bom indicativo apenas para casos onde se trabalha com muito baixas concentrações de tensoativos, o que não foi o caso. Embora tenha havido uma maior amplitude de resultados, o mesmo princípio também se aplica à CMD⁻¹. Deste modo a discussão deste experimento será focada na CMD⁻², visto que,

considerando a característica intrínseca dos surfactantes, estes apresentam amplitudes significativas de resultados de tensão superficial em soluções aquosas apenas em baixas concentrações.

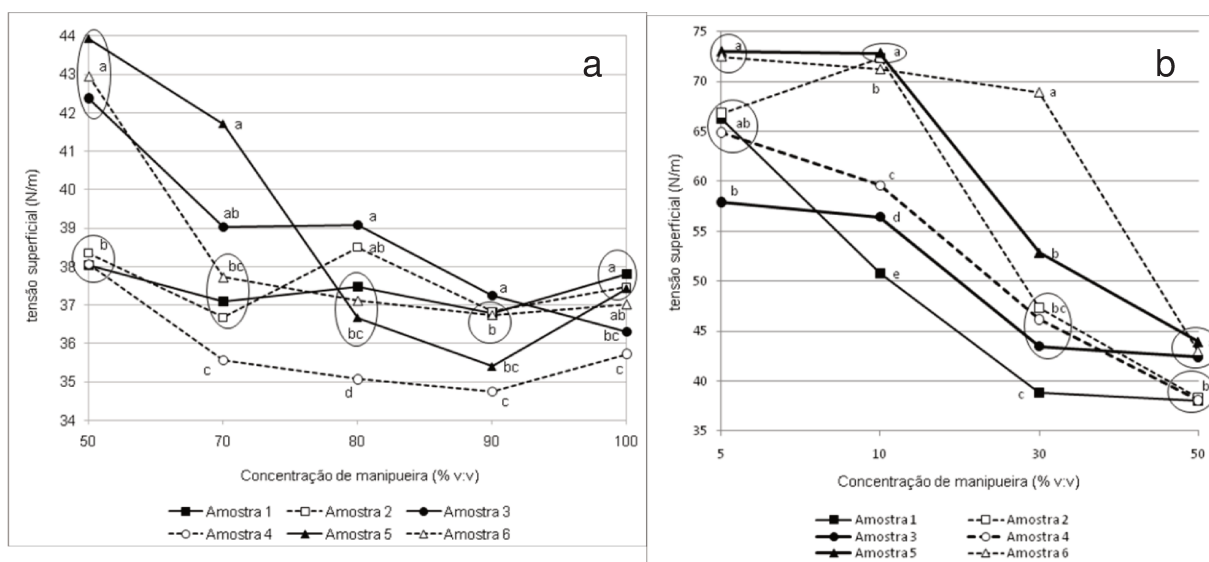
Tabela 3. Média dos resultados de atividade superficial (TS, CMD^{-1} e CMD^{-2} expressos em $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) nas diferentes diluições de manipueira incluindo resultados para o teste de Siegel-Tukey na comparação entre soluções para um mesmo mês⁽¹⁾.

Amostra		Resultados analíticos ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)	Concentração de Manipueira (% v:v)							
Nº	Mês		5	10	30	50	70	80	90	100
1	Abr	TS	28,75 a	26,88 d	26,58 e	26,96 cd	27,10 c	27,14 c	27,39 b	27,32 b
		CMD^{-1}	35,81 a	33,37 b	28,47 cd	28,53 cd	28,25 d	28,35 cd	28,55 c	28,51 cd
		CMD^{-2}	66,29 a	50,75 b	38,85 c	38,04 c	37,10 c	37,48 c	39,41 c	37,81 c
2	Jun	TS	27,20 c	26,91 c	27,17 d	27,28 c	27,54 b	27,63 ab	27,84 a	27,87 a
		CMD^{-1}	33,58 a	30,80 b	29,26 c	28,53 cd	28,25 d	28,52 cd	28,63 cd	28,79 cd
		CMD^{-2}	66,82 b	73,37 a	47,32 c	38,35 d	36,68 d	38,50 d	36,83d	37,48 d
3	Ago	TS	28,75 a	27,56 b	27,45 b	27,52 b	27,55 b	27,37 b	27,33 b	27,36 b
		CMD^{-1}	35,85 a	33,60 b	30,33 c	29,36 d	29,06 d	28,54 e	28,50 e	28,22 e
		CMD^{-2}	57,91 a	56,43 a	43,47 b	42,38 bc	39,03 bcd	39,09 bcd	37,25 cd	36,31 d
4	Nov	TS	29,01 a	27,70 bc	27,19 d	27,82 b	27,40 cd	27,24 d	27,20 d	27,18 d
		CMD^{-1}	38,05 a	33,95 b	28,42 c	28,68 c	27,97 d	27,90 d	27,7 d	27,82 d
		CMD^{-2}	64,91 a	59,61 a	46,17 b	38,07 c	35,56 c	35,07 c	34,75 c	35,73 c
5	Jan	TS	29,12 a	28,05 b	26,75 c	26,75 c	26,90 c	26,80 c	26,80 c	26,66 c
		CMD^{-1}	45,89 a	41,14 a	29,89 b	28,08 b	27,65 b	27,58 b	27,58 b	27,37 b
		CMD^{-2}	73,00 a	72,84 a	52,84 b	43,93 bc	41,71 c	37,11 c	35,40 c	37,43 c
6	Abr	TS	28,31 a	27,82 b	27,99 b	27,51 c	27,25 d	27,43 cd	27,41 cd	27,51 cc
		CMD^{-1}	41,79 a	36,11 b	32,85 c	28,91 d	28,29 d	28,28 d	28,27 d	29,52 d
		CMD^{-2}	72,51 a	71,22 a	68,90 b	42,95 c	37,72 d	36,67 d	36,74 d	37,02 d

Nota: (1) Os resultados estão apresentados em ordem decrescente de tensão superficial ($a>b>c>d>e$). Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%. Deve-se analisar os resultados de uma mesma linha, pois não é possível fazer comparações nesta tabela quanto a diferença significativa entre resultados de meses ou concentrações diferentes.

Deste modo, pode-se perceber em todas as amostras analisadas que não houve diferença significativa ao nível de 5% para os resultados de CMD^{-2} entre fermentados de meios de cultura com concentrações de manipueira iguais ou superiores a 70% (v:v), sendo que, para a amostra 1 (abril de 2008) não houve diferença significativa a partir de 30% (v:v) e nas amostras 2 (junho de 2008), 4

(novembro 2008) e 5 (janeiro de 2009) a partir de 50% (v:v). Considerando estes resultados é possível inferir que é possível diluir o substrato com adição de até 30% de água sem que haja diferença significativa detectável na produção de surfactante pelo método usado. Isso pode permitir uma redução ainda maior de custos ou uma padronização de nutrientes usando água sem maiores prejuízos quanto à produtividade. O aumento na tensão superficial das amostras de CMD⁻² contendo menos de 70% de manipueira, pode ser explicado pelo fato de a concentração de surfactante presente na análise para essas amostras ainda estar próxima à CMC, que para biossurfactante produzido por essa linhagem no mesmo tipo de meio de cultura é descrito por Barros *et al.* (2008)b como valores aproximados de 11 mg·L⁻¹.



Figuras 4a e 4b: Análise estatística (Tukey) dos resultados de CMD⁻² expressos em mN·m⁻¹ nas diferentes diluições de manipueira incluindo resultados para o teste de Siegel-Tukey na comparação entre os mesmos valores de diluição para meses diferentes^{Notas (1) e (2)}.

Nota 1: Os resultados estão apresentados em ordem decrescente de tensão superficial (a>b>c>d>e). Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%. Deve-se analisar os resultados de uma mesma diluição, não sendo possível fazer comparações quanto a diferença significativa entre resultados de diluições diferentes da mesma amostra de manipueira.

Nota 2: Os resultados foram apresentados em dois gráficos para uma representação gráfica com

maior clareza, visto que os valores em concentrações superiores a 50% de manipueira estão muito próximos, impedindo, deste modo, uma visualização adequada.

Também foi realizada a análise estatística visando a comparação de amostras de mesmo nível de diluição em função do período de coleta. Os resultados para o teste de Siegel-Tukey para a comparação entre as concentrações de manipueira para um mesmo mês e diluição são apresentados nas figuras 4a e 4b.

Na comparação dos valores de CMD^{-2} entre as mesmas diluições em períodos diferentes, foi possível verificar que as amostras 5 (janeiro de 2009) e 6 (abril de 2009) apresentam valores de tensão sempre estatisticamente superiores aos demais (*a*, *ab* e *b*) em praticamente todas as diluições (figuras 4a e 4b). A partir desses dados, inferimos que a produção de biossurfactantes foi menor nessas amostras para as referidas concentrações de manipueira. As amostras 1 (abril 2008) e 3 (agosto 2008) apresentaram, respectivamente, maior produção de biossurfactantes em concentrações de manipueira igual ou inferiores a 30%. A amostra 1 foi a de maior produção (menor TS), excetuando-se nos valores de 5%, quando o nível de diluição reduziu significativamente a produção de biossurfactante em todas as amostras. A partir de valores iguais ou maiores que 80% (v:v) de manipueira a produção de biossurfactantes atingiu valores elevados para a maioria das amostras, ou seja, atingiram concentrações iguais ou próximas à Concentração Micelar Crítica (CMC), portanto, os valores de TS foram semelhantes ao encontrados quando é atingida a concentração crítica. Isso faz com que não seja possível a observação de uma tendência definida nessas concentrações. O que é observado é apenas uma aproximação dos valores que se alternam entre os de maior e menor concentração e que apresentam valores não diferenciáveis estatisticamente em um grande número de amostras. Apenas uma amostra não seguiu essa tendência, a amostra 4, que a partir de 50%, manteve-se persistentemente em níveis menores de tensão superficial.

3.3. Análise de correlação entre composição da manipueira e a produção de biossurfactante

Conforme comentado anteriormente, a diferença entre as concentrações mínimas de manipueira necessárias para que não haja decréscimo detectável na produção do surfactante sugere que o período de coleta do substrato ao longo do ano pode afetar a produção desses compostos. Seleccionamos a faixa de 50 e 70 % (v:v) para essa análise, haja vista que em concentrações superiores (>70%) os resultados de tensão superficial estão muito próximos e, em concentrações baixas (<50%) o conteúdo de biossurfactantes está muito diluído, o que pode levar a distorções nos resultados. Assim, foi realizada uma análise de correlação entre concentração de açúcares totais, açúcares redutores, amônio e nitrato. Para as diluições de 50% (v:v), a correlação foi da ordem de 0,43 para os açúcares redutores e de 0,44 para os açúcares totais, o que mostra uma correlação apenas moderada. Para a diluição 70% (v:v), a correlação foi da ordem de 0,75 para os redutores e 0,70 para os totais, o que mostra uma forte correlação. Deste modo, parece haver uma relação estreita entre concentração de açúcares e produção de biossurfactantes. Esses resultados podem estar associados ao fato relatado por Sen (1997), que em um meio sintético usando exclusivamente glicose como fonte de carbono, encontrou valores ótimos em aproximadamente 40g/L.

Quando foi analisada a influência das fontes inorgânicas de nitrogênio, parece não haver uma forte dependência da concentração destes para produção de biossurfactante. Na diluição de 50%, a correlação foi da ordem de -0,18 para amônio e -0,30 para os nitrato, o que mostra uma fraca correlação negativa. Já para a concentração de 70%, a correlação foi da ordem de -0,32 para amônio e -0,46 para o nitrogênio total, o que mostra uma fraca correlação negativa para ambos os casos. Deste modo, considerando as fracas correlações entre as fontes de nitrogênio e a produção de biossurfactante, parece não haver uma relação estreita entre as concentrações de fontes inorgânicas de nitrogênio encontradas e a produção de biossurfactantes.

Finalmente, não foi encontrada correlação estatística positiva ou negativa

consistente para a concentração de minerais. Considerando que muitos micronutrientes podem interferir na produção dos biossurfactante (Sen, 1997) e que houve grande variabilidade na concentração destes elementos, é possível apenas verificar que nenhum deles foi predominante, sendo provável, inclusive, que vários possuam influência ou até interação. Deste modo, sabendo-se que esses fatores não foram padronizados em função dos objetivos do estudo e, pelas características intrínsecas das amostras, não foi possível determinar a escala de importância de cada um dos componentes principais da manipueira. Somando-se a isso, não foi possível avaliar de que forma a diluição aproximou ou afastou as respectivas concentrações de nutrientes de seus pontos ótimos. Essa dificuldade pode facilmente ser estendida a qualquer substrato complexo de composição não controlada.

4. Conclusão

A composição da manipueira pode ser influenciada pelas condições climáticas. A elevação do nível pluviométrico e temperatura afeta especialmente a concentração de açúcares, que são elevadas, e nitrogênio inorgânico expresso em amônia e nitrato, que tem seus teores deprimidos. Essa alteração afeta os níveis de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, que responde positivamente à elevação na concentração de açúcares mantendo níveis elevados de produção mesmo diluídos. De modo geral, a diluição da manipueira em água influencia negativamente a produção de biossurfactante. No entanto, uma redução significativa na produção de biossurfactante só foi detectada em meios de cultura cujas concentrações de manipueira foram menores que 70%. Estes valores foram atingidos independentemente da época do ano na qual as amostras foram coletadas, o que, em um possível processo industrial, poderia permitir uma redução de custos além da padronização de micronutrientes sem redução da produtividade.

5. Referências Bibliográficas

Aguiar, E.B., 2003. Produção e qualidade de raízes de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) em diferentes densidades populacionais e épocas de colheita. Dissertação de Mestrado, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, Brazil.

Barros, F.F.C., 2007. Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.

Barros, F.F.C., Ponezi, A.N., Pastore, G.M., 2008 (a). Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1071-1078.

Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Maróstica Jr, M.R., Pastore, G.M., 2007. Surfactinas: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. Quim. Nova, 30, 409-414.

Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Pastore, G.M., 2008 (b). Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. Ciênc. Tecnol. Aliment., 28, 979-985.

Bicas, J.L., Dionísio, A.P., Silva, J.C., Barros, F.F.C., Pastore, G.M., 2010. Agro-industrial residues in biotechnological processes In: Krause, J., Fleische, O. (eds.), Industrial Fermentation: Food Processes, Nutrient Sources and Production Strategies. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, pp. 275-295.

Bremner, J. M., Mulvaney, C. S., 1982. Nitrogen total in: Page, A.L. (ed.), Methods of Soil Analysis part 2, Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. American Society of Agronomy, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI. pp. 621-637.

CIAGRO - Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas do estado de São Paulo.

<<http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Listagens/MonClim/LMClimLocal.asp>>
accessed in November 10, 2010.

Costa, G.A.N., 2005. Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.

Davis, D.A., Lynch, H.C., Varley, J., 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 322–329.

Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428–434.

Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants, second ed. Academic Press, London, United Kingdom.

Nitschke, M., 2004. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.

Nitschke, M., Ferraz, C., Pastore, G.M., 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.*, 35, 81-85.

Nitschke, M., Pastore, G.M., 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technol.*, 97, 336-341.

Sagrilo, E., Vidigal-Filho, P.S., Pequeno, M.G., Scarpim, C.A., Gonçalves-Vidigal, M.C., Maia, R., Kvitschal, M.V., 2002. Efeito da época de colheita no crescimento vegetativo, na produtividade e na qualidade de raízes de três cultivares de mandioca. *Bragantia*, 61, 115-125.

Sen, R.J., 1997. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. *Chem. Tech. Biotechnol.*, 68, 263-270.

Sheppard, J.D., Mulligan, C.N., 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 110-116.

Capítulo 3: Produção de biossurfactantes em manipueira II: influência do período de colheita da mandioca no processo em biorreator

Resumo

Embora a produção em biorreator de bancada de biossurfactante por *Bacillus subtilis* usando manipueira como meio de cultura já tenha sido descrita na literatura, o efeito da composição desse resíduo no comportamento da fermentação e na produtividade ainda é desconhecido. Neste trabalho, foram coletadas amostras de manipueira resultantes da fabricação de farinha de mandioca a partir da variedade IAC-13 cultivada no município de Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, ao longo de um ano. Nesse período, as amostras foram usadas com meio de cultura em biorreator de bancada e, em seguida, fermentadas por *Bacillus subtilis*. Durante a fermentação, diversos parâmetros foram controlados, assim como a produção de biossurfactante. Alguns desses parâmetros como pH e contagem de células não sofreram alteração significativa independente da variação da composição da manipueira. O mesmo ocorreu com a tensão superficial no meio fermentado, ou seja, esses parâmetros parecem não estar diretamente ligados às diferentes composições de manipueira e à produtividade do processo. Contudo, parâmetros como volume de espuma e concentração de biossurfactante estão diretamente ligados à variação dos constituintes da manipueira.

Palavras-chave: Manipueira, *Bacillus subtilis*, biossurfactante.

1. Introdução

O desenvolvimento do processo produtivo para a produção de lipopeptídios biossurfactantes por *Bacillus subtilis* em manipueira é amplamente demonstrado na literatura. Entre esses trabalhos estão aqueles que descrevem a produção em frasco

de vidro agitados (Nitschke *et al.*, 2004; Nitschke e Pastore, 2006), em fermentador de bancada (Costa, 2005) e em escala piloto (Barros *et al.*, 2008a), além de trabalhos que aprimoraram, por meio de otimização, o tratamento da manipueira para esse fim (Barros *et al.*, 2011). No entanto, uma limitação importante no uso desse resíduo, assim como para outros tipos de matérias-primas agroindustriais que podem ser utilizadas como meio de cultura em bioprocessos, é sua sazonalidade, tanto em termos de volume de produção, como pelas características das matérias-primas que podem variar sensivelmente com a variação climática anual. Este é o caso da mandioca, em cujo processamento é originado a manipueira (Nitschke e Pastore, 2006; Barros *et al.*, 2008a). No estado de São Paulo, o fornecimento do produto aos mercados é sazonal, tendo expressiva oferta concentrada nos meses mais frios e secos, época que coincide com o período de repouso fisiológico (Aguiar, 2003), o que afeta as características da planta e, conseqüentemente, sua composição. O estudo dessa composição e suas variações são importantes, pois, sabe-se que a concentração de açúcares (Nitschke e Pastore, 2006; Sen, 1997), bem como de micronutrientes específicos (Barros *et al.*, 2008a; Sen, 1997) são variáveis de grande importância nesses processos. O objetivo deste trabalho foi o estudo do efeito da composição da manipueira e suas flutuações sazonais na cinética da fermentação bem como na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em biorreator de bancada.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta das amostras

A manipueira usada nos experimentos foi recolhida em uma fábrica localizada no município de Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, Brasil, a partir da prensagem de mandioca variedade IAC-13 produzida no referido município. O resíduo foi exclusivamente obtido pela prensagem da mandioca lavada, descascada e triturada usada para produção de farinha. A coleta ocorreu durante o período de 1 ano, com um intervalo de 2 a 3 meses entre cada coleta, entre abril de 2008 e abril

de 2009, totalizando 6 coletas. Para isso, a manipueira recém extraída foi acondicionada sob refrigeração e encaminhada para câmara frigorífica onde permaneceu armazenada a -18°C para posterior uso.

2.2. Tratamento do substrato

O substrato foi descongelado, aquecido até fervura, resfriado a 5 °C e centrifugado na mesma temperatura a $1,6 \cdot 10^3$ g por 20 minutos. Essa etapa do processo teve como objetivo a solubilização do amido, a decantação de sólidos suspensos e a eliminação do ácido cianídrico. Após esse processo, o mesmo foi chamado de manipueira tratada. Em seguida a manipueira tratada foi colocada na cuba de um biorreator onde foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

2.3. Fermentações

2.3.1. Preparo do inóculo

Para os experimentos, foi utilizada uma cultura de *Bacillus subtilis* identificada como LB5a pertencente à coleção do Laboratório de Bioaromas (DCA/FEA/UNICAMP) (Nitschke, 2004; Costa, 2005; Nitschke *et al.*, 2004, Nitschke e Pastore, 2006; Barros, 2007; Barros *et al.*, 2008a). O inóculo foi preparado a partir de colônias crescidas por 24 horas em placas de Ágar Nutriente a 30 °C. Após crescimento, uma alçada das colônias foi transferida para frasco contendo Caldo Nutriente onde foi incubado a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Após incubação, foi realizada a leitura de densidade ótica na faixa de 660 nm para padronização do inóculo com meio de cultura estéril. Utilizou-se um inóculo com absorvância de 0,5, o que representou em análises microbiológicas realizadas simultaneamente, uma concentração de aproximadamente $3 \cdot 10^8$ UFC·mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado em todos os experimentos deste trabalho.

2.3.2. Experimentos em biorreator e amostragem

As fermentações foram realizadas em fermentador de bancada com cuba de 3,0 L e capacidade útil de 1,5L de substrato tratado e esterilizado conforme descrito anteriormente. As condições de operação foram: temperatura, agitação e aeração mantidos em 30 °C, 150 rpm e 1 vvm, respectivamente. Para o início da fermentação foram adicionados 100 mL do inóculo padronizado conforme item 2.3.1. A partir do momento inicial (0h) e a cada 12 horas foram recolhidas amostras do meio de cultura com as quais foram monitorados os seguintes parâmetros: tensão superficial (TS), diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e 1/100 (CMD^{-2}), pH e contagem padrão em placas (Costa, 2005; Barros, 2007).

Antes do início do processo, foi instalado, na parte superior da cuba do biorreator, um tubo coletor de silicone estéril por onde ocorria a saída da espuma formada durante a fermentação. Este tubo, por sua vez, estava acoplado a um frasco de colapso e acúmulo de espuma mantido à temperatura ambiente (Barros *et al.*, 2008a). A primeira coleta de espuma liquefeita ocorreu após 24 horas do início da fermentação, seguido por coletas sucessivas feitas em intervalos de 12h coincidentes aos da retirada de amostra do biorreator. Posteriormente, a espuma liquefeita, teve seu volume e pH medidos, além de medidas de TS, CMD^{-1} e CMD^{-2} (Costa, 2005; Barros *et al.*, 2008b). Foram realizadas fermentações em duplicata para cada amostra analisada.

2.4. Purificação do biossurfactante

2.4.1. Clarificação da espuma e precipitação ácida (Etapa I)

A espuma recolhida durante o processo foi centrifugada a $1,6 \cdot 10^3$ g por 10 minutos para eliminação de células. O sobrenadante teve seu pH ajustado para 2,0 com solução 2,0 N de HCl e mantido em repouso por 12 horas a 5 °C para decantação. Posteriormente, o líquido foi novamente centrifugado a $1,6 \cdot 10^3$ g por 10 minutos e o precipitado recolhido neutralizado com solução 1,0 N de NaOH e

colocado para secar em estufa de secagem a 50°C com circulação forçada de ar até a secagem completa (Barros *et al.*, 2008a). Em seguida, o sólido, aqui denominado de “biossurfactante bruto”, foi pesado, triturado e armazenado.

2.4.2. Extração com solventes orgânicos (Etapa II)

O biossurfactante bruto foi misturado a uma solução de clorofórmio e metanol 65:15 (v:v) e filtrado em papel de filtro (Whatman nº 1). O permeado foi colocado para secar a 50 °C com circulação forçada de ar até a secagem completa (Barros *et al.*, 2008a). Ao fim desta etapa, o sólido obtido foi chamado de “biossurfactante semipurificado”, sendo então pesado, triturado e armazenado sob congelamento.

2.5. Análises

2.5.1. Caracterização do substrato

Foram realizadas análises de carboidratos totais e açúcares redutores. Além disso, os teores de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn foram realizados por extração nítrico-perclórico e determinados por ICP-OES (Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). O nitrogênio total foi determinado por meio do método de Kjeldahl (Bremner e Mulvaney, 1982). As determinações dos íons amônio (NH_4^+) e íon nitrato (NO_3^-) foram realizadas por destilação (Bremner e Mulvaney, 1982). O pH foi medido em pHmetro (Mettler Toledo 320 pH meter).

2.5.2. Atividade superficial

As amostras de meios de cultura fermentados e as espumas foram previamente clarificadas por centrifugação a $1,6 \cdot 10^3$ g por 10 minutos. Em seguida, foram realizadas medidas de tensão superficial (TS) do sobrenadante e de suas diluições em água destilada nas seguintes proporções: 1:10 ou diluição micelar

crítica 1/10 (CMD^{-1}), e 1:100 ou diluição micelar crítica 1/100, (CMD^{-2}) (Barros *et al.*, 2008b). Todas as medições foram feitas em tensiômetro modelo K12 (A. KRÜSS Optronic GmbH, Alemanha) usando o método da placa (Barros *et al.*, 2008b) em 10 repetições e desvio padrão de 0,2.

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) foi realizada por meio da medida da tensão superficial de diluições seriadas de uma solução de 1 mg.mL⁻¹ do biossurfactante semipurificado. Em seguida, foi identificado o ponto de inflexão da curva de tensão superficial *versus* concentração do biossurfactante de acordo com Sheppard e Mulligan (1987) e Barros *et al.* (2008b).

2.5.3. Contagem microbiológica

As amostras dos meios de cultura fermentados tiveram suas células viáveis contadas por meio de análises das diluições seriadas das mesmas em solução de peptona de caseína 1% (m/v). A seguir, as diluições foram distribuídas em duplicatas em placas de ágar nutriente pela técnica do espalhamento em superfície, sendo então incubadas a 35° C por 24 h (Barros *et al.*, 2008a). Após a incubação foi realizada a contagem do número de colônias, sendo que, para os cálculos de UFC.mL⁻¹, foram considerados os resultados daquelas diluições que apresentaram placas com valores de contagem entre 30 e 300 colônias.

2.6. Tratamento estatístico

Na avaliação da cinética da fermentação, as respostas obtidas para a atividade superficial foram analisadas quanto à diferença significativa ao nível de 5%, utilizando o método de Siegel-Tukey. Foi analisado se as diferenças encontradas foram significativas considerando os diferentes tempos de fermentação para um substrato procedente de um mesmo período de coleta e considerando substratos de períodos diferentes para cada tempo de fermentação. Também foram realizadas análises de correlação de Pearson para avaliar o nível de correlação entre a composição da manipueira, o volume de espuma e a produtividade,

expressada pela quantidade de biossurfactante produzido.

3. Resultados e Discussão

3.1. Variação na composição e pH da manipueira¹

A concentração de açúcares redutores na manipueira tratada foi decrescente a partir da amostra 1 (abril 2008) até atingir um mínimo de $6,1 \text{ g.L}^{-1}$ na amostra 3 (agosto 2009). A partir desse mínimo, os valores foram crescentes até a amostra 5 (janeiro 2009), quando atingiram o máximo em $15,2 \text{ g.L}^{-1}$, decrescendo, então na amostra 6 (abril 2009). O comportamento da concentração de açúcares totais foi semelhante ao de redutores, no qual os valores mínimos foram alcançados nas amostras 2, 3 e 4. A concentração na manipueira variou de um máximo de $22,9 \text{ g.L}^{-1}$ na amostra 5 (janeiro de 2009) a uma mínima de $10,4 \text{ g.L}^{-1}$ na amostra 2 (abril de 2008) (tabela 1).

Quanto à presença de fontes de nitrogênio, foram monitoradas o nitrogênio total, os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-). Quando considerados os valores de N total, não foi observada uma tendência definida, sendo que esses variaram entre 0,4 e $1,0 \text{ g.kg}^{-1}$ (Tabela 1). Quanto aos teores do íon amônio, houve uma tendência de elevação na concentração nas amostras 2 (junho de 2008) e 4 (novembro de 2008), atingindo valor máximo de 105 mg.L^{-1} na amostra 3 (agosto de 2008). Os valores de nitrato não apresentaram uma tendência muito bem definida, oscilando de valores de 32 a 69 mg.L^{-1} .

Considerando a concentração de micronutrientes, esses foram classificados em três grupos: (1) o primeiro com apenas o Alumínio, no qual os valores encontrados foram muito baixos ($<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$), estando abaixo do limite de detecção do método para todas as amostras; (2) o segundo para aqueles com valores inferiores a 1 mg.L^{-1} , onde se encaixaram P, Ca, Mg, S, B e Cu; (3) o terceiro grupo com os componentes cujas concentrações foram, em média, superior a 1

¹ Ver dados completos e discussão detalhada no capítulo 2.

mg.L⁻¹, no qual se ajustam K, Fe, Mn e Zn (tabela 2). Embora os valores de micronutrientes do grupo 2 tenham variado, os mesmos não apresentaram tendência ao longo do período, ocorrendo apenas uma flutuação em torno de determinados valores para cada componente. Exceção ocorreu apenas para a amostra 4, na qual os valores foram sistematicamente menores para todos os minerais analisados. O comportamento do grupo 3 apresentou perfil diversificado quando comparados entre si. Por outro lado, a variação dos teores de K, Mn e Zn foi bastante considerável, chegando, em alguns casos, a uma diferença superior a duas vezes a concentração mínima, além disso, essas alterações foram aleatórias não sendo observada qualquer tendência. O mesmo não foi evidenciado para o Fe, que manteve valores sempre entre 2,0 e 2,8 mg.L⁻¹.

Tabela 1. Períodos das coletas da manipueira e respectivas numeração das amostras, valores de pH e concentração de fontes de carbono e nitrogênio.

Período de coleta		Amostra	pH	Açúcares (g.L ⁻¹)		Nitrogênio		
				Redutores	Totais	Total (g.L ⁻¹)	Amônio (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)
2008	Abril	1	5,7	10,0	18,7	0,6	61,5	57,9
	Junho	2	5,7	7,1	10,4	0,8	76,0	47,0
	Agosto	3	5,9	6,1	12,0	1,0	104,9	68,8
	Novembro	4	5,6	6,6	11,9	0,4	79,6	54,3
2009	Janeiro	5	5,3	15,2	22,9	0,4	47,0	32,0
	Abril	6	5,6	7,7	14,7	1,0	61,5	50,7

O pH das amostras variou de 5,3 a 5,9, estando em linha com resultados anteriores que caracterizam como uma boa faixa de pH para o início da fermentação por *Bacillus* (dados não publicados).

3.2. Cinética do processo

A cinética do processo foi realizada considerando os seguintes aspectos: contagem microbiana, pH e tensão superficial do meio de cultura.

3.2.1. Contagem microbiana e pH

Os valores de contagem microbiana das fermentações realizadas com as diferentes amostras e em diferentes tempos apresentaram pouca variação quando comparadas entre si (figura 1). De modo geral, percebe-se uma elevação acentuada entre 0 e 12 h, o que corresponde à fase exponencial de crescimento do microrganismo. Nesta etapa, os valores de contagens partem de valores próximos a 10^7 UFC·mL⁻¹, chegando a 10^9 por volta de 24 h, quando finalmente atingiram a fase estacionária. A partir desse momento, os resultados permaneceram praticamente estáveis até o fim da fermentação.

Apenas nas amostras 4 e 6 foi observada uma contagem maior a partir de 36 h, mantendo-se assim até 60 h. Contudo, essa diferença foi pequena, apresentando diferenças menores que uma ordem de grandeza. Esse comportamento dos valores de contagem foi observado apenas a partir de 36, pois, nas medições anteriores, de 12 e 24 horas, as contagens foram semelhantes às encontradas na demais amostras. Neste caso parece ter havido um “crescimento residual” capaz de repor por mais tempo, no caso até 60 horas, as células perdidas no arraste da espuma. Esses dados não estão atrelados a quaisquer outros dos parâmetros controlados sejam de processo ou de produtividade e tampouco à composição do meio de cultura, supõe-se, portanto, que seja apenas uma flutuação inerente à fermentação.

Além disso, em ambos os casos, ocorreu uma leve redução nas contagens a partir de desse momento. Esse comportamento, contudo, pode ser explicado pela retirada constante de parte das células presentes no mosto na forma de espuma, associado ao baixo crescimento resultante do esgotamento das fontes de carbono e do acúmulo de metabólitos, fato este já descrito anteriormente (Santos, 2001; Yeh *et al.*, 2006 e Barros *et al.*, 2008a). O mesmo comportamento, não obstante, não foi observado nas demais amostras, que mantiveram seus valores de contagens praticamente constantes desde 12 até 72h. Esse comportamento deve ter ocorrido principalmente pelo fato de que, por ter uma população levemente menor, o consumo de nutrientes e o acúmulo de metabólitos também o foram, fazendo com que as taxas de crescimento, mesmo baixas, fossem mantidas por mais tempo. As

amostras 3 e 5 não tiveram dados apresentados para 72, pois foi atingido o esgotamento da fermentação já em 60h.

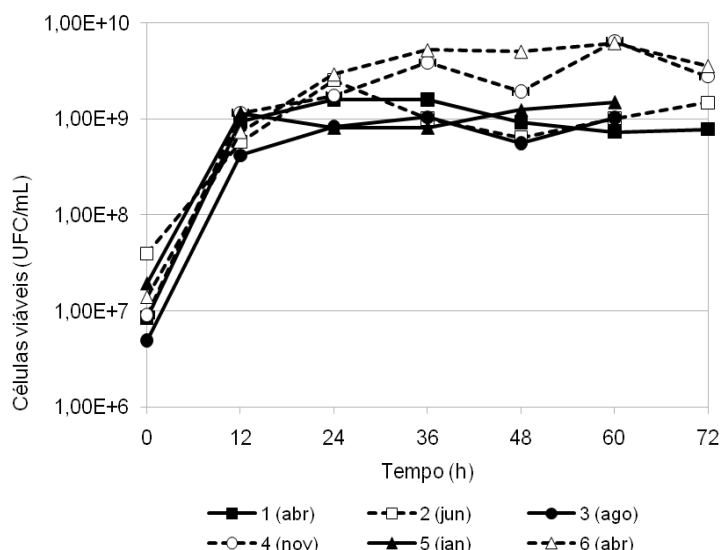
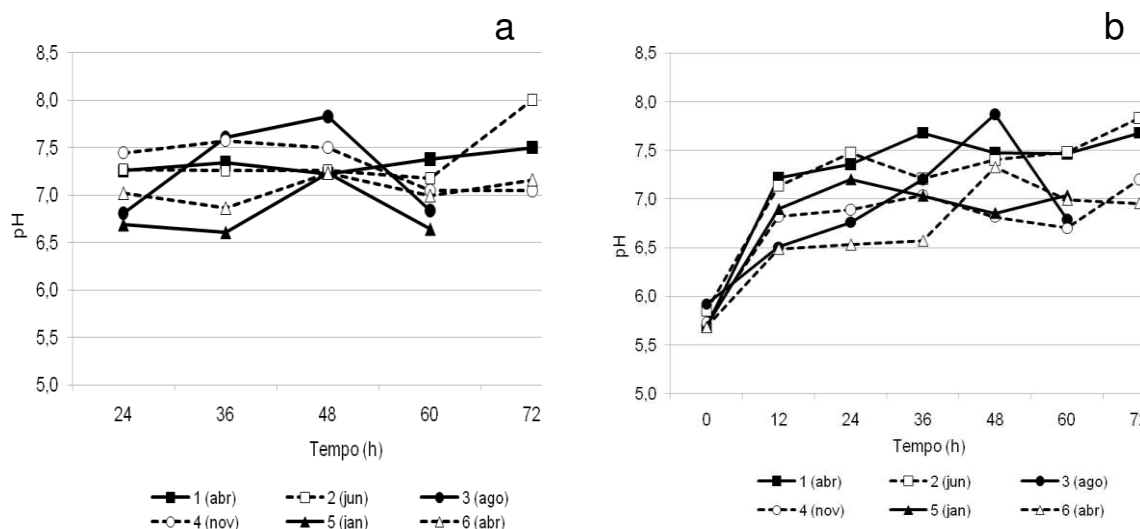


Figura 1. Contagem de células viáveis de *Bacillus subtilis* no meio de cultura por tempo de fermentação.

O comportamento do pH, de modo geral, foi semelhante aos valores de contagem microbiana, ou seja, aumentou em todos os casos, sendo que esse aumento foi maior nas primeiras 12 horas com elevação apenas residual no restante da fermentação (figura 2a). Como a fase de maior elevação do pH coincidiu justamente com a fase de crescimento exponencial, o que nos faz supor que a alteração de ambas esteja fortemente associada. O mesmo comportamento foi descrito por Nitschke e Pastore (2006) e Barros et al. (2008a).

Esta alteração pode estar relacionada à produção de metabólitos secundários excretados durante o crescimento celular e não com o surfactante em si. Esta inferência foi reforçada no fato de que o mesmo comportamento na variação do pH bem como nos valores absolutos em si foi detectado na espuma recolhida (figura 2b). Além disso, foi observado que os biossurfactantes não afetam significativamente o pH, pois considerando que na espuma há uma concentração consideravelmente maior, como será mais bem descrito adiante, uma grande alteração no pH deveria

ter sido notada, o que não foi o caso.



Figuras 2a e 2b. pH do meio de cultura (a) e da espuma (b) em diferentes fermentações de diferentes amostras.

Ainda considerando as amostras coletadas diretamente do fermentador percebe-se que a diferença entre os valores de pH do meio de cultura de diferentes amostras em um mesmo horário apresenta diferença máxima de 0,5 em relação às médias para todas as amostras do respectivo tempo de coleta. Mesmo essa variação não é expressiva pela própria natureza da medição do pH, visto que o mesmo em valores próximos à neutralidade, é muito suscetível a pequenas mudanças. O mesmo comportamento foi observado para a espuma que, por sua vez, apresentou diferenças máximas entre a média geral e as amostras individuais de no máximo 0,5 para cada tempo de coleta. Quando comparadas às médias do meio de cultura e espuma, a diferença máxima foi de 0,1 em relação para cada tempo de fermentação.

3.2.2. Tensão superficial do meio de cultura

Observou-se em todas as fermentações um decréscimo na tensão superficial

(TS) do meio de cultura no início, seguido de um aumento gradativo até o término do processo. A redução inicial provém, possivelmente, da produção de biossurfactante. Assim como os valores de pH e contagem microbiana, uma variação mais acentuada ocorreu nas primeiras 12 horas evidenciando que a produção desses compostos tensoativos, ocorre já a partir da fase de crescimento exponencial, sendo então arrastados para fora do sistema pela espuma a medida que vai sendo produzido.

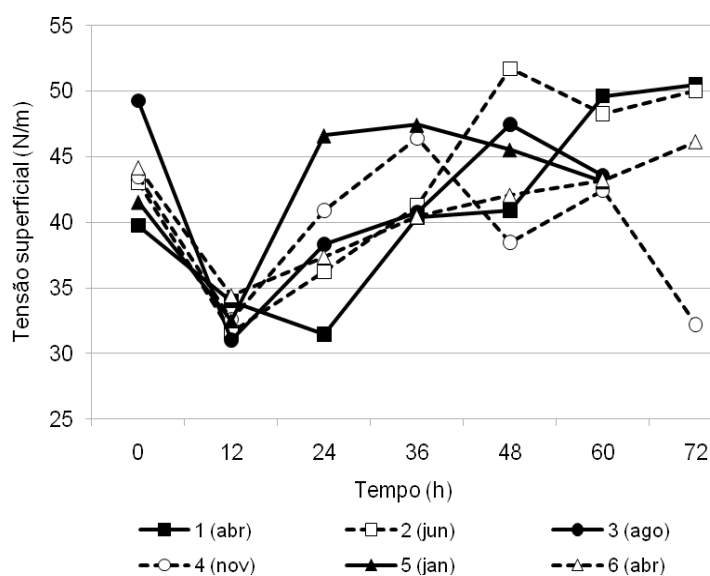


Figura 3. Tensão superficial do meio de fermentação em função do tempo de fermentação.

Na sequência, também para todos os casos, os valores de TS sofreram elevação até atingir valores mais próximos aos iniciais quando então se estabilizaram. Essa elevação ocorreu entre 12 e 36 horas e seu início foi simultâneo à produção de espuma. Essa cinética é mostrada na figura 3. É importante observar que a eliminação de espuma do sistema não começa ao mesmo tempo em que a produção de compostos tensoativos é iniciada. Em um primeiro momento há certo acúmulo para que a coluna de espuma tenha altura suficiente para alcançar o bocal e ser eliminada. Esse comportamento está alinhado aos encontrados por Davis *et al.*, (2001) e Barros *et al.*, (2008a), que demonstraram que a elevação da TS a partir

desse momento está relacionada à extração do biossurfactante do meio de fermentação pela espuma. Essa inferência é reforçada quando se comparam as curvas de TS do meio fermentado (figura 3) *versus* o horário de início de produção de espuma.

Os resultados de TS das amostras do meio de cultura durante a fermentação foram de valores próximos de 32 até 52 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Esses valores evidenciam algumas características do processo independente da amostra em questão:

- (i) As concentrações de surfactante no meio foram sempre próximas ou inferiores aos da concentração micelar crítica em todos os tempos para todas as amostras, pois quando eram preparadas soluções aquosas de biossurfactante semipurificado em concentração igual à CMC, os valores de TS situavam-se em torno de 32 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, que foi um valor nunca transposto durante todo o processo;
- (ii) Considerando que a concentração crítica do biossurfactante produzido foi baixa, aproximadamente 11 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, as concentrações no meio de cultura foram sempre muito baixas quando comparadas às encontradas na espuma (tabela 2);
- (iii) As concentrações de biossurfactante no meio de cultura estão próximas da CMC um pouco antes do início da eliminação de espuma.

3.3. Cinética do processo e produção de biossurfactante

3.3.1. Volume de espuma

A propriedade de formação de uma coluna de espuma está intrinsecamente ligada ao tipo e concentração de um composto tensoativo na solução. Obviamente fatores como viscosidade e densidade do líquido, fluxo de gás, altura da coluna de bolhas e temperatura do sistema também são importantes (Perna, 2010). Considerando que as características de altura da coluna (que era igual à diferença entre o nível de líquido no fermentador e o bocal de saída), a temperatura e o fluxo de gases eram iguais para todos os sistemas, e que a viscosidade era semelhante, a

concentração de compostos tensoativos possui importância primordial no volume de espuma eliminado do sistema durante o processo fermentativo. Portanto, variações na quantidade e/ou cinética de produção dos compostos tensoativos resultam em diferentes cinéticas e volume de produção de espuma. Essa cinética é importante, pois, além dos óbvios resultados econômicos obtidos com a produtividade elevada, influencia diretamente no volume de espuma, ou seja, impacta diretamente nos procedimentos subsequentes de purificação.

Nos experimentos realizados neste trabalho, a formação de espuma iniciou-se em todos os casos partir de 12 h, sendo a primeira coleta realizada sempre com 24 h de fermentação. De modo geral, uma maior taxa de eliminação de surfactante e de volume de espuma ocorreu nas primeiras horas da fermentação (Figura 4). Esse resultado indica uma produção maior de biossurfactante nas primeiras 24 horas do início da formação de espuma fermentação, o que também é discutido por Kim *et al.* (1997) e Barros *et al.* (2008a) e já discutido anteriormente neste capítulo.

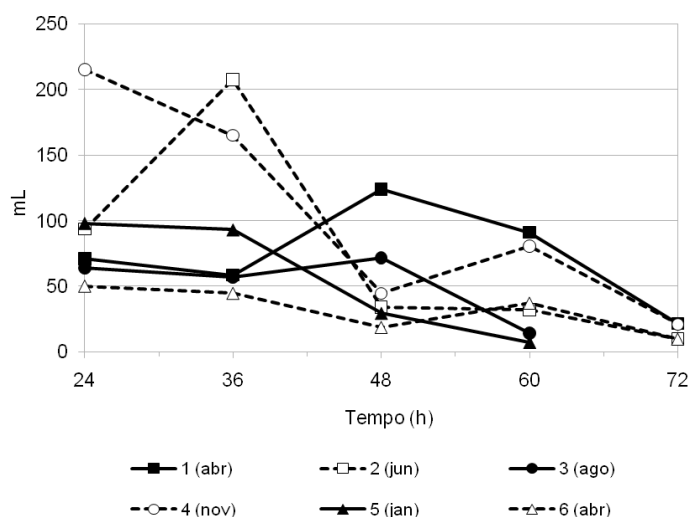


Figura 4. Cinética de produção de espuma obtida nas fermentações por *Bacillus subtilis* das amostras de manipueira coletada em diferentes meses.

Contudo, os volumes totais bem como a cinética de produção de espuma mostraram comportamento diferenciado nos diferentes meses. Considerando apenas os volumes totais, estes variaram de 160 a 526 mL (figura 5), os maiores

valores foram obtidos nas fermentações das amostras 1 (abril de 2008), 2 (junho de 2008) e 4 (novembro de 2008). Conforme observado na figura 4, e discutido anteriormente, de um modo geral, o volume de produção de espuma é decrescente ao longo do processo, apresentando uma maior velocidade de eliminação no período entre 24 e 36 horas e caindo mais acentuadamente no período entre 36 e 48 horas e praticamente se esgotando logo após as 60 horas, sendo que em alguns casos, a espuma foi completamente esgotada um pouco antes desse período. Nas fermentações que apresentaram um maior valor total de produção de espuma, a velocidade de eliminação foi nitidamente maior nas primeiras horas.

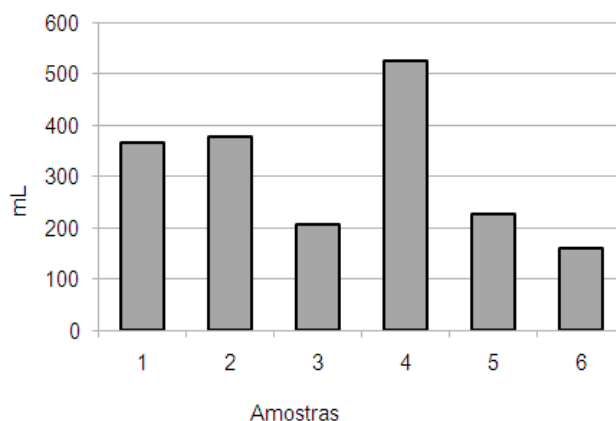


Figura 5. Volume total de espuma obtido nas fermentações em diferentes amostras.

Nas horas finais do processo, ambos os grupos, o de elevado e o de baixo volume, aqui arbitrariamente divididos, convergiram para valores muito próximos da taxa de eliminação de espuma. Apenas a amostra 1 mostrou um comportamento nitidamente diferente das demais, iniciando em volumes mais baixos e atingindo um pico de produção em média, 12 horas depois, no período entre 24 e 48 horas, o que está em concordância com os resultados de tensão superficial do meio. Embora tenha havido esse retardo, o volume final de espuma produzida foi bastante próximo ao da amostra 2, por exemplo, que apresentou cinética semelhante às demais.

3.3.2. Medidas de atividade superficial na espuma e produção de biossurfactante

Analisando os dados contidos na tabela 2 é possível observar que a TS para todas as espumas liquefeitas analisadas, independente do tempo de fermentação, foram sempre próximas a $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, o que demonstra uma concentração de biossurfactantes em níveis superiores à CMC. Isso faz com que seja difícil uma comparação entre amostras diferentes usando este parâmetro, pois, à medida que a concentração de surfactantes em solução aquosa aproxima-se ou é superior à CMC, não há praticamente variação na tensão superficial (Sheppard e Mulligan, 1987; Barros *et al.*, 2008b).

Essa pouca variabilidade é demonstrada, inclusive, por meio da análise estatística, visto que na maioria dos casos, todos os tempos de cada amostra tiveram uma TS sem diferença estatisticamente significativa nas condições apresentadas. Desse modo, não é possível distinguir, avaliando apenas da tensão superficial, soluções com elevadas quantidade de biossurfactantes, mesmo que suas concentrações sejam significativamente diferentes. Por isso, este parâmetro (TS) é um bom indicativo apenas para baixas concentrações de tensoativos, o que não é o caso. Embora tenha havido uma maior amplitude de resultados, o mesmo princípio também se aplica à CMD^{-1} . Assim, a discussão relativa às medidas de atividade superficial da espuma será majoritariamente focada na CMD^{-2} neste experimento.

As concentrações elevadas evidenciadas acima foram mantidas ao longo de todo o processo, o que pode ser confirmada pela estabilidade da TS bem como, em menor escala, da CMD^{-1} , cujos valores foram praticamente fixos em uma faixa em torno dos mínimos, apesar de alguns medidas de CMD^{-1} das amostras 1 (abril de 2008) e 2 (junho de 2008) tenham sido superiores a $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ após 60 horas de fermentação. Quando confrontados com os dados de tensão superficial da espuma com os das amostras recolhidas diretamente do fermentador observa-se que os resultados de tensão superficial são muito maiores para o mosto do que para a espuma. Esse comportamento indica que a concentração de surfactante na espuma é bastante superior, evidenciando, assim, a eficiência do método de coluna de

bolhas para a recuperação primária do surfactante do meio de cultura fermentado.

Tabela 2. Dados de atividade superficial para a espuma clarificada coletada em diferentes tempos de fermentação de amostras de manipueira coletada em diferentes períodos⁽¹⁾⁽²⁾.

Amostra			Tempo de Fermentação (h)				
Número	Período	Análises (mN·m ⁻¹)	24	38	48	60	72
1	Abril 2008	TS	28,0 c	28,9 b	29,3 ab	29,7 a	28,9 b
		CMD ⁻¹	28,1 d	28,5 d	29,9 c	31,3 b	32,4 a
		CMD ⁻²	30,1 e	33,3 d	36,1 c	45,0 b	44,9 a
2	Junho	TS	27,7 d	28,2 c	29,9 a	28,7 b	29,6 a
		CMD ⁻¹	27,9 d	28,9 c	30,5 b	30,5 b	32,1 a
		CMD ⁻²	30,5 d	35,0 c	40,4 b	41,6 b	51,3 a
3	Agosto	TS	27,4 b	28,9 a	28,7 a	27,5 b	
		CMD ⁻¹	27,6 c	28,2 a	29,2 a	27,9 b	
		CMD ⁻²	29,0 b	32,1 a	32,9 a	32,3 a	
4	Novembro	TS	27,7 c	28,3 abc	28,7 a	28,3 ab	28,0 bc
		CMD ⁻¹	27,8 b	28,8 a	29,1 a	29,1 a	28,8 ab
		CMD ⁻²	31,5 b	34,1 abc	34,6 a	36,3 a	36,8 a
5	Janeiro 2009	TS	27,2 b	28,7 a	28,9 a	28,8 a	
		CMD ⁻¹	27,8 c	29,9 b	30,1 ab	30,6 a	
		CMD ⁻²	30,9 c	36,3 b	35,3 b	40,3 a	
6	Abril	TS	27,5 c	29,1 b	29,9 ab	30,0 a	30,2 a
		CMD ⁻¹	27,5 c	29,3 b	30,3 a	30,5 a	30,7 a
		CMD ⁻²	28,7 c	31,0 b	33,6 a	33,7 a	33,7 a

Nota 1: Os resultados estão apresentados em ordem decrescente de tensão superficial (a>b>c>d>e). Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%. Devem-se analisar os resultados de uma mesma linha, não é possível fazer comparações nesta tabela quanto a diferença significativa entre resultados de linhas diferentes;

Nota 2: As lacunas não preenchidas correspondem às fermentações cuja produção de espuma foi esgotada com 60 horas de fermentação. As fermentações com dados para 72 horas atingiram esgotamento entre 60 e 72 não tendo, necessariamente, a duração total de 72 horas.

Ainda analisando os dados contidos na tabela 2, é possível observar que para a espuma recolhida entre 12 e 24 horas em todas as fermentações, os valores de CMD^{-2} apresentaram valores em torno de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Esses dados permitem concluir que as concentrações do biossurfactante em todas as amostras são ainda mais elevadas na espuma no início da produção. Durante o decorrer do processo, contudo, uma redução na concentração foi percebida, pois em algumas amostras houve elevação constante estatisticamente significativa nas medidas após as 24 horas. Pode-se perceber, ainda, que houve diferença significativa ao nível de 5% na tensão superficial da espuma entre os tempos de fermentação e que essa diferença sempre foi resultante do aumento da tensão superficial da espuma. Isto está relacionado à diminuição da concentração de surfactante no meio de cultura durante a fase estacionária durante a fermentação, pois uma vez que o meio possui menor concentração de surfactina, menor será a quantidade removida pela espuma, fazendo com que haja um esperado aumento de tensão superficial. Esse comportamento é mais bem ilustrado na figura 6.

Além disso, também foi possível observar que as fermentações nas quais foram encontrados os maiores valores de CMD^{-2} (figura 6) entre 12 e 24 horas eram as mesmas nas quais foram recolhidos os maiores volumes de espuma no mesmo período (figura 4), bem como durante todo o processo (figura 5). De fato, há uma forte correlação positiva, de 0,79, entre os valores de produção total de espuma e a CMD^{-2} , assim como houve forte correlação positiva, de 0,82, entre a CMD^{-2} e o volume de espuma coletada entre 12 e 24 horas. Ou seja, as amostras em cujas fermentações apresentaram maiores volumes de espuma possuíam as menores concentrações de surfactante. Desse modo, é possível concluir que a presença dos lipopeptídios estudados não foi o único indutor de produção de espuma. Isto provavelmente deve acontecer devido à produção microbiana ou com a pré-existência de outros compostos como peptídeos ou proteínas, compostos que também são capazes de formar espuma sem, contudo apresentar elevada atividade tensoativa (Perna, 2010).

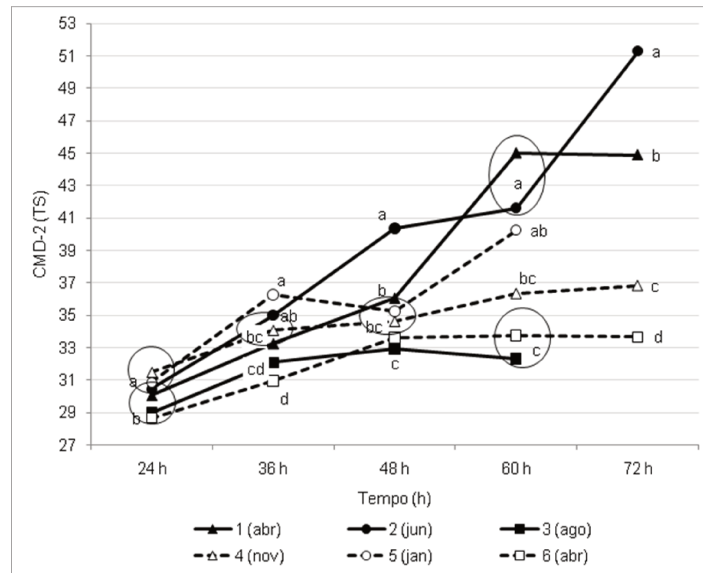


Figura 6. Médias da diluição micelar crítica CMD^{-2} para as espumas clarificadas de diferentes tempos de fermentação realizadas em diferentes amostras de manipueira⁽¹⁾.

Nota 1: Os resultados estão apresentados em ordem decrescente de tensão superficial ($a > b > c > d > e$). Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%. Devem-se analisar os resultados de um tempo, não é possível fazer comparações neste gráfico quanto a diferença significativa entre resultados de tempos diferentes.

A tendência descrita anteriormente foi mantida até o fim do processo, momento em que, com a redução da concentração da biossurfactante em todas as amostras, essa diferença entre as concentrações ficou ainda mais evidente (figura 6). Assim, as amostras 1 (abril de 2008), 2 (junho de 2008) e 4 (outubro de 2008) apresentaram uma elevação maior na CMD^{-2} . Um caso atípico foi observado na fermentação da amostra 5 (janeiro de 2009), onde houve elevação semelhante às encontradas nas amostras 1 e 2, mesmo com baixo volume de espuma, o que evidencia baixa produtividade.

3.4. Análise de correlação entre composição da manipueira e volume de espuma

Considerando o volume de espuma produzido, não houve correlação forte, nem negativa, nem positiva, com a concentração de açúcares totais, açúcares redutores, amônio e nitrato e nitrogênio total. Provavelmente esse comportamento seja explicado em parte por um trabalho realizado por Sen (1997), no qual os valores ótimos para fontes de nitrogênio inorgânico, açúcares expressos em glicose e alguns minerais para *Bacillus subtilis* ficaram acima da concentração encontrada nas manipueiras usadas no experimento. Ou seja, como os níveis nutrientes da manipueira estavam abaixo do ótimo, um ou mais desses poderiam atuar como limitante, fazendo com que houvesse interferência nos resultados finais. Outra explicação complementar pode estar no fato de que a manipueira é um substrato de composição bastante complexa, de modo que a existência de componentes, identificados ou não, bem como a interação entre estes que pode afetar o desenvolvimento microbiano e mascarar resultados.

Outra possibilidade para elucidação de tal comportamento deve-se, provavelmente, a componentes não quantificados ou avaliados na manipueira como proteínas, peptídios ou outros componentes com propriedade de formação ou supressão de espuma. Um indicativo dessa suposição pode ser, por exemplo, a existência de uma correlação negativa moderada entre os teores de nitrogênio total (que inclui o N orgânico) e volume de espuma. Quanto ao teor de metais, houve apenas fortes correlações negativas com as concentrações de fósforo e magnésio, -0,86 e -0,84, respectivamente. No entanto, não podemos afirmar, com certeza, que esses fatores são importantes em função do anteriormente exposto.

Contudo, como discutido anteriormente, foi percebida uma correlação positiva entre volume de espuma com a CMD^{-2} , forte nas primeiras horas e moderada à medida que a fermentação avança. Ou seja, parece haver uma vinculação inversa entre quantidade de biossurfactante em solução, que é inverso à CMD^{-2} e volume de espuma. Contudo, sabe-se que outro fator também atua sobre o sistema: segundo o trabalho realizado em coluna de bolhas com espuma produzida em fermentações de

manipueira por *Bacillus subtilis* descrito por Perna (2010), quando há uma menor concentração de surfactante, os valores da taxa de enriquecimento são maiores. Definindo-se enriquecimento como $E = C_{\text{espuma}} \cdot (C_{\text{meio}})^{-1}$, onde C_{espuma} é a concentração de biossurfactante na espuma e C_{meio} a concentração de biossurfactante no meio de cultura.

4. Conclusão

Independente da variação da composição da manipueira ao longo do período pesquisado, o comportamento quanto ao pH do meio de cultura bem como os resultados de contagem de células foi homogêneo. O mesmo comportamento ocorre em relação à tensão superficial nas amostras de meio fermentado e o volume de espuma e concentração de biossurfactante após colapso da mesma, indicada pelas medidas de atividade superficial, ou seja, esses parâmetros parecem não estar diretamente ligados a diferentes composições de manipueira e produtividade, mas são características comuns ao processo, ou seja, nessa combinação de micro-organismo/linhagem, meio de cultura e condições de fermentação.

5. Referências Bibliográficas

Aguiar, E.B., 2003. Produção e qualidade de raízes de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) em diferentes densidades populacionais e épocas de colheita. Dissertação de Mestrado, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, Brasil.

Barros, F. F. C., Dionísio, A. P.; Silva, J. C., Pastore, G. M., 2011. *Use of the Response Surface Methodology to optimize the pre-treatment of cassava wastewater employed as substrates for the production biosurfactants* In Cassava: Farming, Uses, and Economic Impact; Pace, C. M. Ed.; Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY.

Barros, F.F.C., Ponezi, A.N., Pastore, G.M., 2008 (a). Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35, 1071-1078.

Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Maróstica Jr, M.R., Pastore, G.M., 2007. Surfactinas: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. Quim. Nova, 30, 409-414.

Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Pastore, G.M., 2008 (b). Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. Ciênc. Tecnol. Aliment., 28, 979-985.

Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982. Nitrogen total in: Page, A.L. (ed.), Methods of Soil Analysis part 2, Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. American Society of Agronomy, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI. pp. 621-637.

Costa, G.A.N., 2005. Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Davis, D.A., Lynch, H.C., Varley J., 2001. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. Enz. Microbial. Technol., 28, 346–354.

Kim, H., Yoon, B., Lee, C., Suh, H., Oh, H., Katsuragi, T., Tani, Y., 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. J. Ferment. Bioeng., 84, 41-46.

Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428–434.

Nitschke, M., Ferraz, C., Pastore, G.M., 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.*, 35, 81-85.

Nitschke, M., Pastore, G.M., 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technol.*, 97, 336-341.

Perna, R.F., 2010. Fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Santos, C.F.C., Produção, purificação e caracterização de biossurfactante produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.

Sen, R.J., 1997. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. *Chem. Tech. Biotechnol.*, 68, 263-270.

Sheppard, J.D., Mulligan, C.N., 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 110-116.

Yeh, M., Wei, Y., Chang, J., 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.*, 41, 1799-1805.

Capítulo 4: Produção de enzimas de interesse industrial por linhagens de *Bacillus subtilis* produtoras de biossurfactante

Resumo

As bactérias do gênero *Bacillus* são fonte de grande parte das enzimas de interesse industrial comercializadas na atualidade. Os maiores volumes de enzimas consumidas mundialmente estão entre as hidrolases e, entre essas, as amilases, proteases e lipases, todas com aplicações em vasta gama de produtos e processos industriais. Processos fermentativos de *Bacillus subtilis* em manipueira são relatados na literatura. Contudo a mesma combinação microrganismo e meio de cultura para produção de enzimas é bastante restrita, senão inexistente. Para isso, algumas linhagens desse micro-organismo testadas previamente como produtoras de biossurfactante em manipueira foram testadas em crescimento em placas e em mais duas etapas subsequentes: meio sintético líquido e manipueira. As linhagens LB1a e LB5a foram identificadas como boas produtoras de enzimas, especialmente amilases e proteases. Além disso, os valores de atividade enzimática foram maiores na manipueira do que em meio sintético com a presença de indutores para estas enzimas.

Palavras-chave: Amilase, Protease, Lipase, *Bacillus subtilis*, manipueira.

1. Introdução

As espécies do gênero *Bacillus* são reconhecidas como boas produtoras de enzimas de interesse industrial. Essas bactérias são responsáveis pelo abastecimento de cerca de 50% do total dessas biomoléculas comercializadas mundialmente (Schallmey *et al.*, 2004), mercado este que foi estimado em 1,6

bilhões de dólares, sendo 29% destas destinadas à indústria alimentícia, 15% para rações animais e 56% em outras aplicações (Outtrup *et al.*, 2002). Uma das principais vantagens do uso dessas espécies na produção de enzimas está no fato de que são facilmente cultivadas e mantidas em laboratório, pois as mesmas possuem a capacidade de se adaptar a mudanças das condições de cultivo que dificultariam o desenvolvimento e a síntese enzimática em outros micro-organismos (Kunst *et al.*, 1995).

Entre as diferentes categorias de enzimas, as hidrolases estão entre as de maior aplicação industrial e, entre essas, as amilases a alfa-amilase e a beta-amilase têm recebido especial atenção (Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007). Estas enzimas catalisam a hidrólise do amido e são produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, contudo, para aplicação comercial são basicamente derivadas do gênero *Bacillus* (Syu e Chen, 1997; Pandey *et al.*, 2000; Teodoro *et al.*, 2000; Schallmey *et al.*, 2004; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007), como *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, e *B. amyloliquefaciens*. São aplicadas em diversos setores industriais tais como alimentos, fermentações, têxteis, detergentes e indústria papeleira (Pandey *et al.*, 2000; Teodoro *et al.*, 2000; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007). As principais amilases produzidas por *Bacillus* são termorresistentes, o que é interessante comercialmente já que muitos processos necessitam de elevadas temperaturas. Desse modo, a termosensibilidade deixa de ser um fator limitante no emprego das mesmas (Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007).

Outro importante grupo de enzimas é o das proteases, que representa cerca de 30% do total comercializado mundialmente (Nascimento *et al.*, 2007), sendo sua aplicação predominante nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica e de detergentes (Schallmey *et al.*, 2004). Alguns micro-organismos produzem uma quantidade baixa destas enzimas dificultando sua aplicação industrial. Porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar o rendimento de produção. As proteases termoestáveis produzidas por *Bacillus* sp estão entre as mais importantes industrialmente (Nascimento *et al.*, 2007).

Finalmente, as lipases, enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, sendo amplamente utilizadas na química orgânica devido à sua elevada especificidade e seletividade (Martín *et al.*, 2008). Por esse motivo recebem muita atenção devido ao seu uso potencial em processos industriais (Lesuisse *et al.*, 1993), especialmente como biocatalisadores. Entre as razões do enorme potencial dessa enzima estão incluídas: alta estabilidade em solventes orgânicos, o não requerimento da presença de co-fatores, e uma larga especificidade pelo substrato (Martín *et al.*, 2008). No entanto, essas enzimas são apenas moderadamente estáveis a altas temperaturas em que a maioria dos processos é realizada. Isso pode ser resolvido com o uso de lipases produzidas por micro-organismos termofílicos (Martín *et al.*, 2008). O *Bacillus subtilis* secreta diferentes tipos de lipases que variam em função de diferentes condições de crescimento, fatores ambientais, como pH e abastecimento aminoácidos (Eggert *et al.*, 2003).

O objetivo desse trabalho foi estudar de amilases, proteases e lipases produzidas em meios sintéticos e manipulada por linhagens de *Bacillus subtilis* previamente reconhecidas como produtoras de biossurfactantes.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos e preparo do inóculo

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *Bacillus subtilis*: ATCC 21332, da *American Type Culture Collection* e LB2B, LB115, LB117, LB1a, LB5a, LB114, LB262, LB157 e LB2a pertencentes à coleção do Laboratório de Bioaromas (DCA/FEA/Unicamp). Todas as linhagens foram previamente identificadas como produtoras de lipopeptídios surfactantes (Nitschke *et al.*, 2004). Essas culturas foram mantidas em ágar nutriente inclinado e mantidas sob refrigeração entre 5 e 7°C.

Para os experimentos em meio sólido, o inóculo foi preparado em placas de ágar nutriente (30 °C, 24 h) a partir das quais as colônias isoladas com crescimento característico (colônias de forma irregular, bordas ondulares, cor esbranquiçada, aspecto ceroso e com elevação achatada) foram transplantadas através de agulha

de platina. Nos experimentos em meio líquido, alçadas dessas mesmas culturas foram transferidas para 50 mL de caldo nutriente e incubadas a 30 °C, agitação de 150 rpm por 12 horas.

Após incubação, foi determinada a absorbância a 660 nm para padronização, considerando uma curva padrão previamente construída com contagem microbiana *versus* absorbância de acordo com (Barros *et al.*, 2008). Assim, uma absorbância de 0,5 representou uma concentração de aproximadamente 3.10^8 UFC.mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado em todos os experimentos deste trabalho. A cada frasco com meio líquido, tanto os sintéticos como em manipueira tratada, foi inoculado com 1 mL da cultura padronizada.

2.2 Meios de cultura

Para uma melhor compreensão, os meios de cultura foram classificados neste trabalho em sólidos complexos, líquidos sintéticos e manipueira. Todos os meios prontos foram mantidos sob refrigeração até o uso.

2.2.1 Meios sólidos complexos

Os meios sólidos complexos usados foram:

- Ágar diferencial para micro-organismos produtores de lipases extracelulares descrito por Lin *et al.* (1995) em % (m/v) em água destilada: óleo de oliva 2,0; peptona 0,3; extrato de levedura 0,2; K₂HPO₄ 0,2; MgSO₄.7H₂O 0,1; Na₂CO₃ 0,1; ágar 2,0; rodamina B 0,001.
- A formulação utilizada para micro-organismos produtores de proteases extracelulares foi feita conforme descrito por Giongo (2006) em g.L⁻¹ de água: peptona de carne, 5,0; extrato de levedura 3,0; leite em pó desnatado 10,0; ágar 12,0. O mesmo meio foi adaptado para avaliação da presença de amilases extracelulares, sendo, para isso, substituído na mesma proporção o leite em pó desnatado por amido de mandioca.

2.2.2 Meio líquidos sintéticos

Os meios líquidos foram preparados a partir de um meio basal preparado com a seguinte composição em g.L⁻¹ de água destilada: extrato de levedura 1,0; KH₂PO₄ 2,0; (NH₄)₂SO₄ 5,0; citrato de sódio 1,0; MgSO₄·7H₂O 0,2; CaCl₂·2H₂O 0,01; FeCl₃ 0,001; MnSO₄·7H₂O 0,001; ZnSO₄·7H₂O 0,001. Os suplementos de fontes de carbono foram adicionados na proporção de 1,0 % (v/v), para líquidos, ou (p/v), para sólidos, de acordo com a seguinte descrição: óleo de oliva para lipase, glicose para protease e amido de mandioca para amilases. Após preparo, os meios foram distribuídos em porções de 50 mL em Erlenmeyers com capacidade 125 mL e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

2.2.3 Manipueira

A manipueira usada nos experimentos foi recolhida em uma fábrica localizada no município de Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, Brasil. Para isso, a manipueira recém extraída foi acondicionada sob refrigeração e encaminhada para câmara frigorífica onde permaneceu armazenada a -18 °C para posterior uso. A manipueira foi descongelada, aquecida até fervura, resfriada a 5 °C e centrifugada a 5 °C, 1,6·10³ g por 20 minutos. Esse processo teve como objetivo a solubilização do amido, a decantação de sólidos suspensos e a eliminação do ácido cianídrico. Após esse processo, a mesma foi chamada de manipueira tratada. Após preparo, os meios foram distribuídos em porções de 50 mL em Erlenmeyers com capacidade 125 mL e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

2.3 Seleção de culturas em meio sólido

Cada cultura estudada foi inoculada com uma agulha de platina em uma placa com o ágar específico para cada experimento. Todas as culturas foram incubadas a 30 °C por 72 horas, sendo que, a cada 24 horas foram medidos os diâmetros das colônias e halos eventualmente formados. O diâmetro médio foi dado por duas

medidas em eixos perpendiculares. A medida considerada para os halos foi igual ao diâmetro total dos mesmos, subtraído o diâmetro da colônia. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes, resultando em quatro resultados para cada combinação micro-organismo *versus* enzima avaliada.

2.4 Processo fermentativo em meio líquido

Para todos os experimentos e linhagens foram usados 50 mL do meio sintético basal suplementado com fontes de carbono descritas anteriormente e acondicionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos com os meios de cultura foram inoculados com 1 mL de inóculo e incubados a 30 °C e agitação de 150 rpm por 60 horas. Em intervalos regulares de 12 horas foram recolhidos 2 mL de amostras para medida de atividade enzimática.

2.5 Amostragem nos experimentos em meio líquido

Durante a fermentação dos meios sintéticos foi realizada amostragem de cada tratamento/indutor em intervalos aproximados de 6 horas. Para a manipulação a amostragem ocorreu a cada 12 horas, sendo que todas as análises provinham de um mesmo tratamento. A coleta das amostras foi realizada assepticamente em câmara de fluxo linear e encaminhadas para medida de atividade enzimática.

2.6 Medida de atividade enzimática

2.6.1 Preparo do extrato enzimático

Após incubação, cada amostra colhida nos intervalos regulares foi acondicionada em tubos tipo Eppendorf de 2 mL e centrifugada a $3,9 \cdot 10^3$ g em centrífuga de eppendorf por 5 minutos para a remoção das células, sendo o sobrenadante usado para dosagem da atividade enzimática. O sobrenadante foi chamado de extrato enzimático. No caso dos extratos para lipase, foi escolhida a

fase intermediária, haja vista que se formaram três fases, uma inferior (sólida), uma intermediária (aquosa) e uma superior (lipídica).

2.6.2 Medida de atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi baseada na capacidade dos extratos de promover a hidrólise da caseína. Para isso, 0,5 mL do extrato enzimático foi adicionado a 5 mL de uma solução de caseína 1,2 % (p/v) preparada em tampão fosfato (pH 7,0). Após mistura vigorosa, os frascos foram incubados em banho a 37 °C durante 30 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 4 mL de tampão acetato 0,2 M (pH 4,0), resfriada em banho de gelo (0°C) e filtrada em papel filtro. Foi recolhido 1 mL do filtrado ao qual foi adicionado 3 mL de NaOH e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:1 em água destilada. Em seguida as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 660 nm. Para cada grupo de análise foi feito um branco no qual o extrato foi substituído por água destilada. A atividade enzimática foi determinada com uma curva padrão com tirosina equivalente. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de μ moles de tirosina liberada por mL de enzima por hora (Macedo *et al.*, 2005).

2.6.3 Medida de atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi baseada na capacidade do extrato de promover a hidrólise do amido solúvel. Neste caso, 0,5 mL do extrato foi adicionado a 5 mL de uma solução 1,0 % (p/v) de amido solúvel em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0). Os frascos foram incubados em banho a 37 °C durante 10 minutos. Após a incubação, a reação foi paralisada com a adição de 5 mL da solução HCl 0,1 N. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de uma solução 5-0,5% (p/v) de iodeto-iodato diluída na proporção 1:1 com solução HCl 0,1N. Paralelamente, foi feito um branco para a reação e um branco para o substrato. O branco para a reação foi feito de maneira similar, diferenciando-se apenas pela substituição do extrato enzimático por água destilada. O branco do substrato foi feito com 5 mL da solução de HCl 0,1 N, 5 mL

de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0) e 0,5 mL de água destilada. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 580 nm e a atividade foi mensurada utilizando-se uma curva padrão de amido. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a redução de 0,1 mg de amido em 10 minutos de reação por 0,5 mL de enzima (Syu e Chen, 1997).

2.6.4 Medida de atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi baseada na capacidade do extrato de promover a hidrólise dos triacilgliceróis do azeite de oliva. Neste caso, 1 mL do extrato foi adicionado a frascos contendo 4 mL de tampão fosfato 20 mM (pH 9,0), 1 mL de CaCl_2 110 mM, 5 mL de emulsão 25% (v/v) de óleo de oliva em goma arábica 7 % (m/v). Os frascos foram incubados em banho com agitação a 160 rpm, 40 °C durante 20 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de acetona:etanol (1:1), permanecendo ainda no banho com agitação por mais 5 minutos. O teste em branco como controle consistiu de 15 mL da mistura de acetona:etanol (1:1) adicionados antes da solução enzimática, de maneira que a enzima não atuasse na reação. Os ácidos graxos produzidos foram titulados com NaOH 0,05 M usando 20 μL de fenolftaleína (0,5 % em etanol) como indicador. Uma unidade de lipase (1U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de ácido graxo por minuto ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$), nas condições descritas acima (Prazeres *et al.*, 2006; Prazeres, 2006).

3. Resultados e discussão

3.1 Seleção de culturas em meio sólido

Todas as linhagens estudadas apresentaram halo nos experimentos realizados, indicando a produção de enzimas extracelulares capazes de hidrolisar os respectivos substratos.

O uso de meios sólidos suplementados com triglicerídeos emulsificados é uma metodologia padrão para a seleção de micro-organismos produtores de lipases (Cardenas *et al.*, 2001; Prazeres, 2006). Apesar da alcalinidade do meio, todas as linhagens foram capazes de crescer e produzir halo, indicando a existência de lipases extracelulares capazes de hidrolisar os lipídios do azeite de oliva. Entre as linhagens estudadas a LB5a apresentou os melhores resultados para lipase em todos os horários em que foram realizadas as medições (24, 48 e 72 h), atingindo halo máximo de 9,8 mm em 72 horas (figura 1).

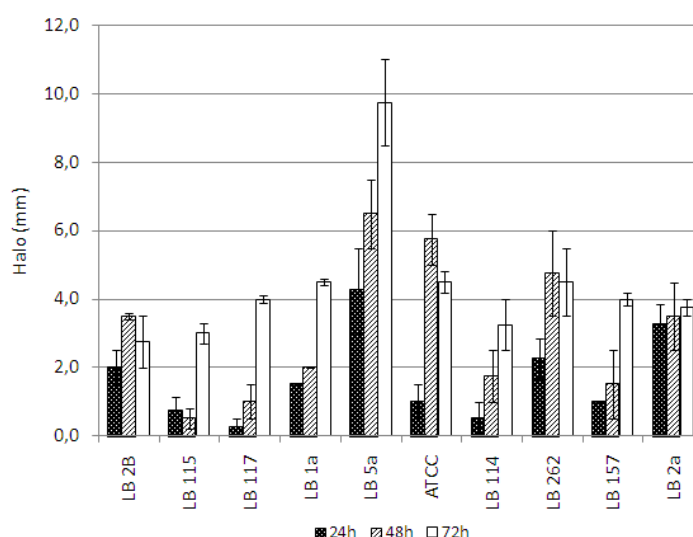


Figura 1. Diâmetro médio dos halos nas placas indicadoras de lipase para cada linhagem de *Bacillus subtilis*.

Embora não haja uma relação positiva forte entre o tamanho de halo produzido em meio sólido com a produção de lipase alcalina em meio líquido, há uma maior intensidade de atividade lipolítica alcalina entre os micro-organismos classificados no grupo de halo de maior amplitude (Prazeres, 2006). Além disso, conforme trabalhos anteriores relatados por Nitschke *et al.* (2004), essa linhagem apresentou um bom nível de produção de biossurfactante, o que seria, portanto, interessante em um processo produtivo integrado. Deste modo, a linhagem foi selecionada para experimentos posteriores. É possível observar também que, a partir de determinado tempo, em algumas linhagens ocorreu uma redução no halo

considerado, devido ao crescimento da colônia em velocidade superior a de formação do halo.

No experimento de triagem de amilase, a cultura LB5a apresentou os melhores resultados, inclusive considerando o grande crescimento da colônia na placa (12,0 mm), bem acima da segunda, a ATCC 21332, que apresentou 6,5 mm de diâmetro médio de halo em 72 h. Neste experimento não foi possível medir o halo de todas as linhagens em todos os horários visto o grande desenvolvimento das colônias, superior aos experimentos de lipase e protease. Assim, a medida dos diâmetros das colônias e halos foi prejudicada, pois grande parte das placas teve crescimento extremamente elevado, onde algumas linhagens já ocupavam a placa inteira nas primeiras 24 h.

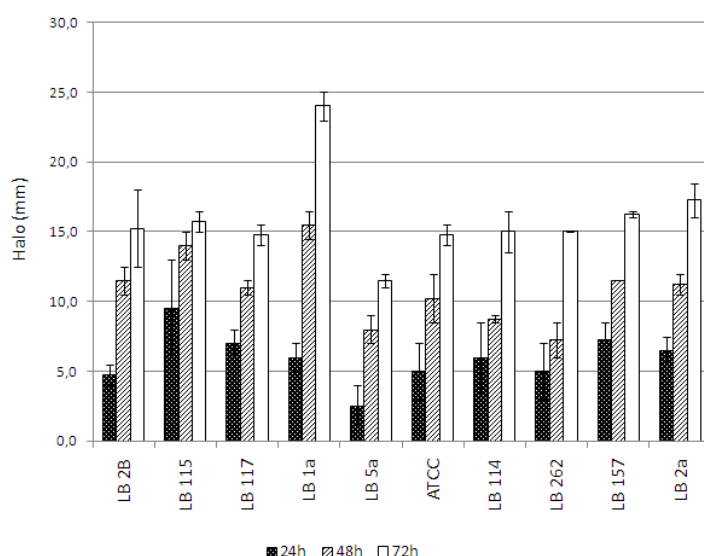


Figura 2. Diâmetro médio dos halos nas placas indicadoras de protease para cada linhagem de *Bacillus subtilis*.

A linhagem LB5a apresentou os maiores halos para lipase e amilase, a exceção foi para proteases (figura 3). Contudo, combinado ao fato de que a mesma apresenta boa produção de biossurfactantes, torna-se um diferencial. Além disso, a mesma apresentou bons resultados para lipase e amilase. Não obstante, considerando-se que o alvo final é a produção em manipueira, o fato de apresentar bons resultados

na hidrólise do amido de mandioca é um dado significativo. Adicionalmente, a linhagem LB1a apresentou bons resultados para lipase. Embora a produção de biossurfactantes tenha sido inferior a LB5a (Nitschke *et al.*, 2004), a linhagem também foi selecionada para experimentos de atividade em meio líquido.

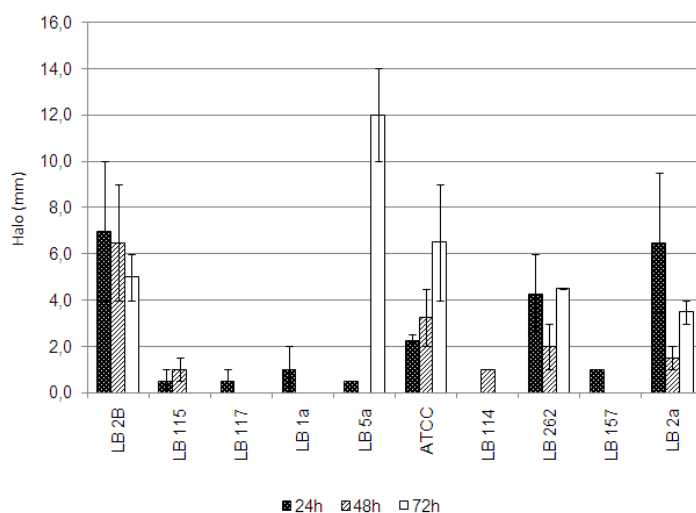
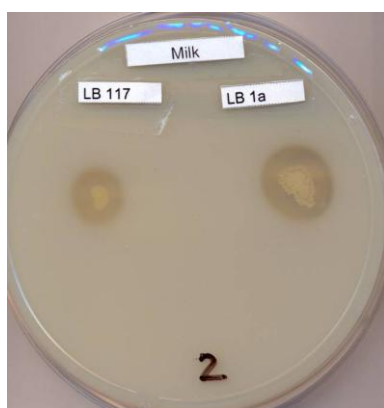
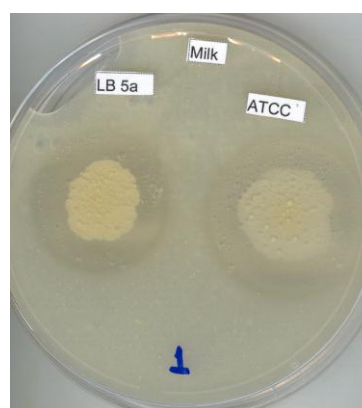


Figura 3. Diâmetro do halo nas placas indicadoras de amilase para cada linhagem de *Bacillus subtilis*.



a



b

Figura 4a e 4b. Placas de ágar leite com 24 h (a) e 72 h (b) para as linhagens LB 117 e LB1a (a) e LB5a e ATCC21332 (b) no quais os halos de proteólise são evidentes.

3.2 Atividade enzimática em meio líquido sintético

Os experimentos para detecção de atividade enzimática em meio líquido sintético confirmaram os dados encontrados na triagem em meio sólido, já que foi identificada atividade enzimática para os três tipos de substratos em praticamente todas linhagens selecionadas no experimento anterior.

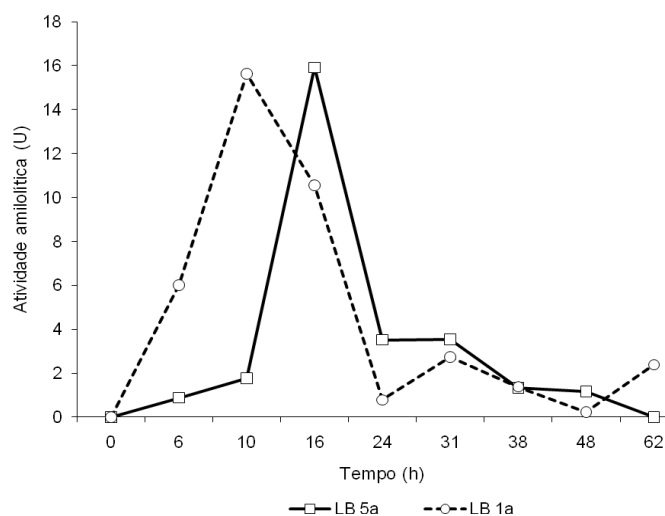


Figura 5. Cinética de atividade amilolítica das linhagens LB5a e LB1a crescidas em meio sintético suplementado com amido de mandioca 1% (p/v).

A figura 5 ilustra a curva de atividade amilolítica das linhagens selecionadas em função do tempo de fermentação. Desta forma é possível verificar ocorreu uma intensa elevação da atividade nas primeiras horas. Os máximos de atividade atingiram valores em torno de 16 U, resultado semelhante para as linhagens avaliadas. A diferença ocorreu nos tempos em que foram atingidos os máximos de atividade: respectivamente, 10 e 16 horas para LB1a e LB5a. Essa elevação na atividade demonstra que, de fato, as linhagens pesquisadas são capazes de usar o amido de mandioca como fonte de carbono, já que essa era a única fonte disponível no meio, e que a produção de enzimas com esse objetivo, como seria esperado, ocorre nas primeiras horas de fermentação.

Embora, neste caso, o processo tenha sido ainda mais acelerado, as intensas elevações de atividade nas primeiras horas são compatíveis com dados encontrados na literatura (Teodoro *et al.*, 2000), para os quais o ápice de produção enzimática gira em torno de 20 e 36 horas de acordo com a variação das condições utilizadas. Em seguida, poucas horas depois de atingido o máximo, houve redução acentuada dos valores de atividade para níveis ao redor de 4 até zero U para todas as linhagens, fato que está ligado ao esgotamento dessa fonte de carbono no meio de cultura.

Quando comparado aos resultados encontrados nos experimentos em meio sólido (figura 3) há uma aparente discrepância, pois no experimento em placas, a linhagem LB1a apresentou valores baixos para 24 horas e nulo para 48 e 72. Os dados da etapa preliminar poderiam indicar, desse modo, uma atividade enzimática muito baixa. No entanto, se for considerado o forte desenvolvimento da cultura nos meios rico em amido a ponto de encobrir a placa em poucas horas há uma indicação contrária, ou seja, o crescimento celular foi mais intenso nos meios ricos em amido porque a cultura teve melhores condições de sobreviver e crescer nesses substratos. Isso demonstra que ambas as linhagens estavam melhores adaptadas a esse substrato. Na linhagem LB5a, contudo, esse comportamento foi observado nas primeiras 48 horas, a partir de então a cultura aparentemente perdeu seu ímpeto de crescimento fazendo com que a mancha de hidrólise conseguisse ser difusão mais rápida que o próprio crescimento da colônia. Isso pode estar relacionado tanto ao fato de ter um aumento de atividade em meio sintético mais lento.

Quando considerada a atividade proteolítica (figura 6), houve uma elevação gradual nos níveis desta ao longo da fermentação, tendo comportamento semelhante nas duas linhagens estudadas. A atividade enzimática, mesmo no ponto máximo, não foi muito elevada, sendo que os picos de atividade alcançaram valores em torno de 1,2 U para LB5a e 1,3 U para LB1a. A reduzida atividade pode estar relacionada ao fato de que não havia necessariamente um indutor, apenas uma fonte de carbono, no caso, a glicose, e não havia um substrato também protéico. Além disso, as linhagens foram previamente selecionadas como boas produtoras de biossurfactante (Nitschke *et al.*, 2004), o que faz com que, neste caso específico, a

baixa atividade proteolítica provavelmente seja uma condicionante para essa elevada produtividade, pois a degradação do surfactante produzidos por *Bacillus subtilis* 21332 em tempos mais avançados de fermentação demonstrou relação direta com a atividade de protease presente no meio (Nitschke, 2004).

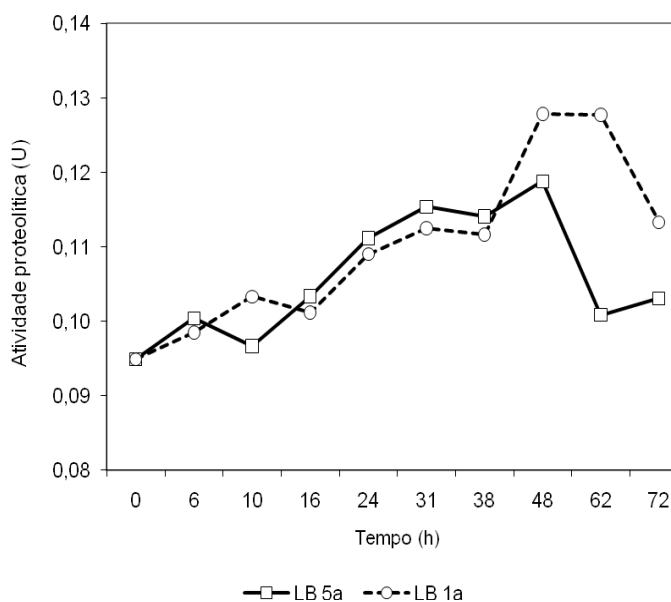


Figura 6. Cinética de atividade proteolítica das linhagens LB5a e LB1a crescidas em meio sintético cuja fonte de carbono foi glicose 1% (p/v).

Os picos de atividade foram atingidos simultaneamente, em torno de 48 horas, embora a linhagem LB1a tenha mantido valores próximos ao máximo por mais tempo, atingindo 62 horas. Essa manutenção da atividade em níveis mais elevados por mais tempo pode estar relacionado aos resultados encontrados em meio sólido (figura 2). Essa inferência decorre do fato de que os valores de atividade proteolítica testadas em meio sólido foram consistentemente maiores para a linhagem LB1a. Provavelmente, essa diferença no comportamento das culturas meio sólido desde as primeiras horas pode estar relacionada ao fato de que havia uma significativa quantidade de substrato protéico, fato que não ocorreu no meio sintético.

A atividade maior de protease apenas em tempos mais avançados da fermentação também foi relatada por Nitschke (2004) que mostra que a cepa *B. subtilis* 21332 apresentou uma queda acentuada na concentração de surfactante após 48 horas de cultivo, sendo que a degradação do biosurfactante ocorreu provavelmente em função de proteases presentes no meio. Em seguida, poucas horas depois de atingido o máximo, houve redução acentuada dos valores de atividade para níveis próximos ao inicial. Essa redução pode estar relacionada ao esgotamento total de fontes de carbono e o início da fase de decaimento do crescimento celular.

Para a atividade lipolítica não houve variação significativa na atividade ao longo da fermentação seus valores permaneceram sempre em torno de 4 a 4,5 U de atividade durante praticamente todo o processo (figura 7).

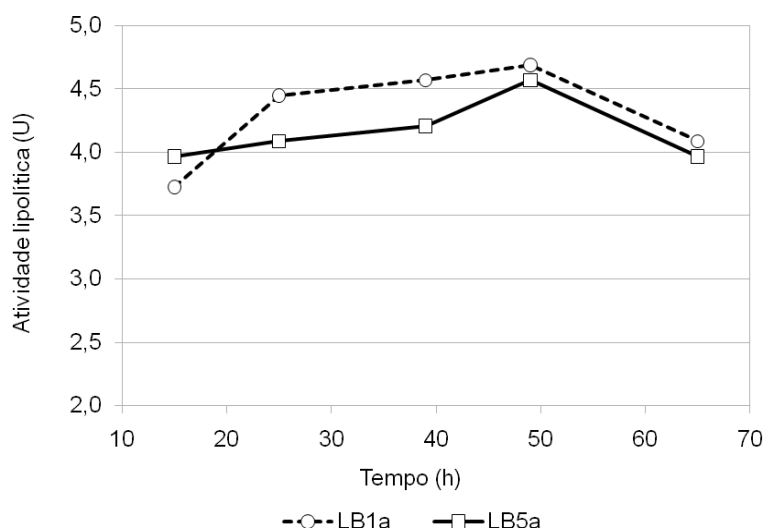


Figura 7. Cinética de atividade lipolítica das linhagens LB5a e LB1a de *Bacillus subtilis* crescidas em meio sintético suplementado com azeite de oliva 1% (p/v).

3.3 Atividade Enzimática em Manipueira

Considerando a literatura sobre o crescimento de *Bacillus* em manipueira (Barros *et al.*, 2011), foram realizados experimentos usando esse resíduo como meio

de cultura. Nestes experimentos foram utilizadas as mesmas linhagens selecionadas para o estudo anterior, ou seja, LB1a e LB5a. Ambas foram capazes de produzir os três tipos de enzimas na manipueira, assim como ocorreu no meio sintético formulado com indutor. No entanto, a modificação do meio de cultura, no caso, a substituição de um meio sintético por um meio complexo, afetou significativamente os resultados encontrados.

Considerando a atividade amilolítica da cultura crescida em manipueira (figura 8), os resultados de atividade foram superiores. A diferença, nesse caso, foi encontrada na comparação entre o nível de atividade das duas linhagens. Assim, ao contrário do meio sintético, onde os valores foram similares, na manipueira a linhagem LB1a apresentou valores aproximadamente 40 vezes superiores aos do meio sintético, enquanto a linhagem LB5a apresentou valores 10 vezes maiores. Essa diferença entre as atividades enzimática das linhagens no momento de pico pode estar relacionada aos resultados encontrados tanto em meio sólido, como em meio sintético, pois a linhagem LB5a foi a primeira a perder o vigor de crescimento celular em meio sólido, assim como foi a que teve um desenvolvimento mais demorado em meio sintético, o que poderia indicar um menor poder amilolítico da linhagem quando comparada à LB1a.

Quanto à cinética, os comportamentos de ambas as linhagens foram similares entre si como quando comparadas ao meio sintético, ou seja, apresentaram grande elevação da atividade enzimática nas primeiras horas seguida de uma grande redução em curto espaço de tempo. Essa intensa elevação inicial está provavelmente vinculada ao fato de que a manipueira tratada possui em sua composição açúcares de alto molecular, sobretudo amido solúvel, e açúcares de baixo peso molecular, principalmente sacarose, frutose e glicose, sendo que o consumo da cultura é preferencial pelo segundo grupo (Costa, 2005). Desse modo, após o esgotamento dos açúcares de menor peso molecular, a cultura passou a produzir amilases de modo a disponibilizar os carboidratos resultantes dessa hidrólise para seu metabolismo. Um indicativo desse comportamento é mostrado por Barros *et al.* (2008) que, em fermentação de manipueira pela linhagem LB5a em biorreator, detectou uma elevação da concentração de açúcares redutores nas

primeiras 12 horas de fermentação enquanto a concentração de açúcares totais tinha, simultaneamente, um forte declínio.

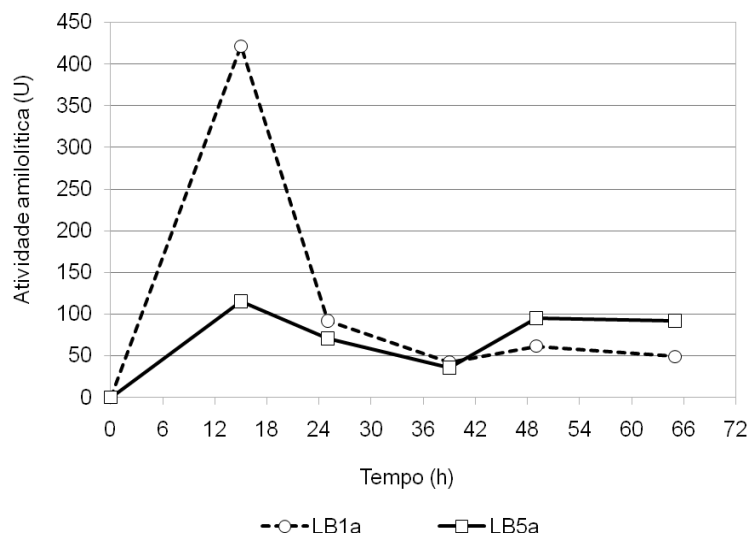


Figura 8. Cinética de atividade amilolítica das linhagens LB5a e LB1a de *Bacillus subtilis* crescidas em manipueira tratada.

A atividade proteolítica expressa pelas duas linhagens foram, na manipueira (figura 9), maiores que os resultados obtidos em meio sintético durante todo o processo (figuras 6). No meio manipueira, para as duas linhagens, os máximos foram atingidos em períodos semelhantes aos encontrados no meio sintético, ou seja, ao redor de 50 horas. Apenas no final da fermentação, a partir do pico de atividade, a diferença entre os meios de cultura torna-se não significativa, especialmente pela grande redução da atividade em ambos os casos.

Quando comparadas as duas linhagens (figura 9), nota-se melhores resultados para LB1a. No meio sintético as diferenças foram significativas apenas durante e logo após os máximos de atividade ao redor das 48 horas. Na manipueira, ao contrário, os resultados de atividade de LB1a foram consistentemente superiores a LB5a ao longo de todo o processo, excetuando-se, novamente, apenas no esgotamento do processo, pois a atividade é reduzida dramaticamente em todos os casos, seja de tipo de meio ou linhagem estudada. Na comparação com o meio

sintético, os resultados foram superiores para as duas linhagens ao longo de toda a fermentação, sendo que a linhagem LB1a apresentou uma maior elevação. Esses dados reforçam a discussão feita anteriormente, especialmente para a linhagem LB5a previamente selecionada como boa produtora de biossurfactante (Nitschke *et al.*, 2004), o que faz com que, neste caso específico, a baixa atividade proteolítica seja, provavelmente, uma condicionante para essa elevada produtividade (Nitschke, 2004).

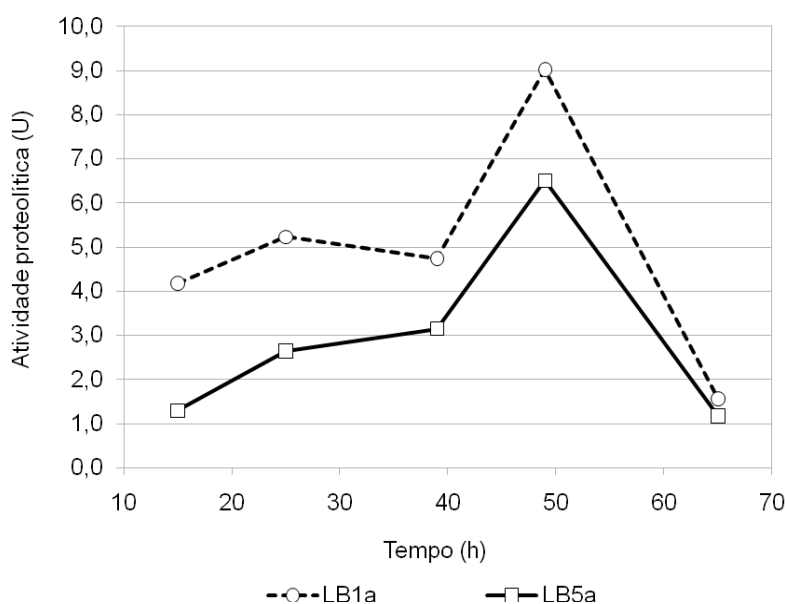


Figura 9. Cinética de atividade proteolítica das linhagens LB5a e LB1a de *Bacillus subtilis* crescidas em manipueira tratada.

No caso da atividade lipolítica (figura 10), os valores de atividade permaneceram praticamente constantes em todos os tempos analisados para ambas as linhagens. No entanto, os resultados encontrados na manipueira foram menores durante toda a fermentação quando comparado ao meio sintético nas duas linhagens (figura 7). Além disso, ao contrário dos resultados em meio sintético em que o comportamento das duas linhagens foi semelhante, os resultados em manipueira foram significativamente e consistentemente menores. As reduções foram mais intensas para LB5a que diminuiu em mais de 50% a atividade em

manipueira quando comparado ao meio sintético, durante todo o processo, enquanto para a linhagem LB1a, a redução oscilou em torno de 30%. Essa redução em ambas as culturas pode ser explicada pela ausência de indutor na manipueira.

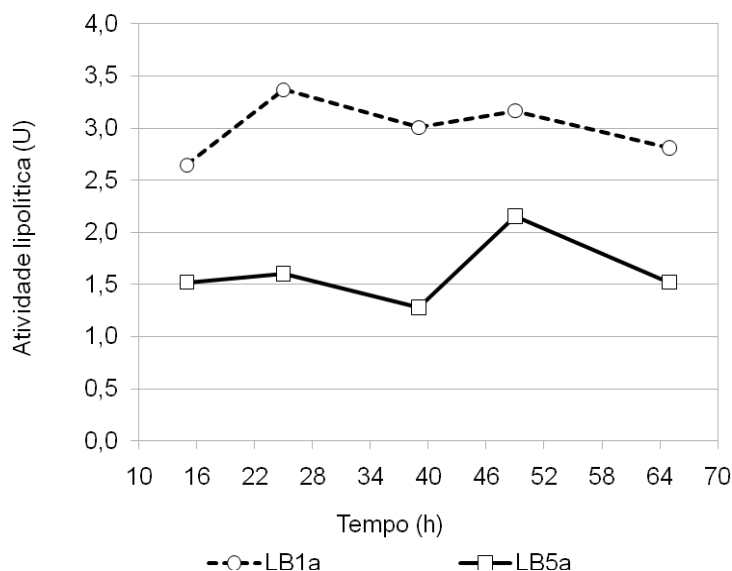


Figura 10. Cinética de atividade lipolítica das linhagens LB5a e LB1a de *Bacillus subtilis* crescidas em manipueira tratada.

4. Conclusão

Dentre as 10 linhagens de *Bacillus subtilis* testadas para produção de enzimas, duas, no caso LB1a e LB5a, foram identificadas como potenciais fontes de amilases e proteases. Dados esses ainda não encontrados na literatura. Essa habilidade de produção foi identificada, inclusive, em manipueira. Isto indica a possibilidade de um processo integrado de obtenção dessas enzimas juntamente com biossurfactantes, compostos também produzidos por essas linhagens em fermentações em manipueira. O desenvolvimento dessas culturas expressando atividade enzimática extracelular em substratos agroindustriais pode proporcionar maior viabilidade econômica, pois pode possibilitar a obtenção de mais de um produto no mesmo processo. Além disso, por apresentar valores de atividade

enzimática maior em manipueira do que em meio sintético suplementado com indutores, pode-se afirmar que a mesma possui um grande potencial como substrato alternativo para a produção dessas enzimas.

5. Referências Bibliográficas

F.F.C. Barros, A.N. Ponezi, G.M. Pastore, Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) 1071-1078.

T. Eggert, U. Brockmeir, M.J. Dröge, W.J. Quax, K-E. Jaeger, Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* 225 (2003) 319-324.

F. Kunst, G. Rapoport, Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 2403-2407.

E. Lesuisse, K. Schanck, C. Colson, Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216 (1993) 155-160.

S-F. Lin, C-M. Chiou, Y-C. Tsai, Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnol. Lett.* 17 (1995) 956-962.

G.A. Macedo, G.M. Pastore, H.A. Sato, Y.K. Park, Bioquímica Experimental de Alimentos, first ed., Editora Varela, Brasil, 2005.

J.R. Martín, M. Nus, J.V.S. Gago, J.M. Sánchez-Montero, Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids at high temperatures using a thermostable lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: A comparative study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 52-53 (2008) 162-167.

W.C.A. Nascimento, C.R. Silva, R.V. Carvalho, M.L.L. Martins, Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciê. Tecnol. Aliment.* 27 (2007) 417-421.

M. Nitschke, C. Ferraz, G.M. Pastore, Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial residues. *Braz. J. Microbiol.* 35 (2004) 81-85.

H. Outtrup, S.T. Jorgensen, The importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes, in: R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, D. De Vos (Eds.), *Applications and systems of Bacillus and relatives*, Wiley-Blackwell Science Inc, Malden, MA, United States, 2002, pp. 206-218.

F.F.C. Barros, A.P. Dionísio, J.C. Silva, G.M. Pastore, Potential uses of cassava wastewater in biotechnological processes, in: C.M. Pace (Ed.) *Cassava: Farming, Uses, and Economic Impact*, Nova Science Publishers, Inc., NY, United States, 2011, pp.

M. Schallmey, A. Singh, O.P. Ward, Development in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50 (2004) 1-17.

C.E.S. Teodoro, M.L.L. Martins, Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.* 31 (2000) 298-302.

F. Cardenas, E. Alvarez, M-S. Castro-Alvarez, J-M. Sanchez-Montero, M. Valmaseda, S.W. Elson, J-V. Sinisterra, Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel ungal and yeast lipases. *J. Mol. Catal.y B: Enzym.* 14 (2001) 111-123.

Z. Konsoula, M. Liakopoulou-Kyriakides, Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 150-157.

J.L. Giongo, Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp., Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Dissertação de Mestrado, Brasil, 2006.

A. Pandey, P. Nigam, C.R. Soccol, V.T. Soccol, D. Singh, R. Mohan, Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31 (2000) 135–152.

M-J. Syu, Y-H. Chen, A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chem. Eng. J.* 65 (1997) 237-247.

J.N. Prazeres, J.A.B. Cruz, G.M. Pastore, Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2006) 505-509.

J.N. Prazeres, Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*. Universidade Estadual de Campinas – Tese de Doutorado, Brasil, 2006.

M. Nitschke, Produção e caracterização de biossurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Universidade Estadual de Campinas – Tese de Doutorado, Brasil, 2004.

Capítulo 5: Produção de Diacetil e Acetoína por *Bacillus subtilis* em manipueira

Resumo

Embora existam métodos produtivos estabelecidos para produção de aromas, há uma crescente importância dada aos bioaromas, especialmente os de origem microbiana. Esse crescimento ocorre em função de uma demanda de mercado por produtos que possam ser rotulados como naturais. Entre os diversos trabalhos desenvolvidos nos últimos anos estão os que apresentam a manipueira como substrato ou como meio para crescimento de biomassa para posterior biotransformação. No entanto, o estudo dos compostos voláteis produzidos durante fermentações com *Bacillus subtilis* nesse meio de cultura ainda não foram relatados. Neste trabalho foi realizada uma fermentação em biorreator de bancada no qual um sistema de amostragem por *headspace* dinâmico por SPME foi instalado no aparato de exaustão do fermentador. Os principais voláteis identificados foram butanodiona (diacetil) e 3-hidroxi 2-butanona (acetoína), sendo o segundo quantitativamente predominante com valores máximos de aproximadamente 1,1 g.L⁻¹. A produção de ambos os compostos foi mais intensa entre 12 e 18 horas de fermentação, período simultâneo ao final da fase exponencial de crescimento, e foi aparentemente inibida pela adição, mesmo em baixos volumes, de meio de cultura estéril indicando que a formação de ambos os voláteis pode ter forte relação com o metabolismo secundário.

Palavras-chave: Diacetil, acetoína, *Bacillus subtilis*, manipueira.

1. Introdução

A produção de butanodiona (ou diacetil) por via fermentativa é bastante

conhecida, entretanto, com o desenvolvimento da síntese química a partir da butanona, essa via foi completamente suplantada. Contudo, atualmente, a produção de compostos químicos de interesse comercial por via fermentativa é crescente em função do ressurgimento do interesse no desenvolvimento de processos biológicos que possuam aplicações industriais (Serebrennikov, 1995; Mariotto, 2007; Bicas *et al.*, 2010). Isso se reflete também no setor de aromas no qual, apesar da via química ou a extração direta de fontes animais e vegetais serem predominantes, é observada uma elevação no uso de bioaromas (Martins, 2003; Bicas *et al.*, 2010). Isso ocorre especialmente em virtude da preocupação dos consumidores nos cuidados com a alimentação, o que tem estimulado o desenvolvimento de produtos com compostos descritos como “naturais” ou “produzidos naturalmente” (Bicas *et al.*, 2010). A 3-hidroxi 2-butanona (ou acetoína), por sua vez, é obtida por processos fermentativos e está, em geral, associada a outros compostos de aroma tais qual diacetil, sendo a acetoína um produto da redução parcial do mesmo. Ambos possuem descritores aromáticos semelhantes sendo associado a creme e manteiga/amanteigado. Portanto, estes voláteis compõem o aroma característico de muitos produtos lácteos, além de serem encontrados também em outros produtos, como vinagre e café (Antinone *et al.*, 1999; Carvalho, 1999) e fermentados de soja (Owens *et al.*, 1997). Micro-organismos do gênero *Bacillus* são conhecidos como produtores destes compostos voláteis (Owens *et al.*, 1997; Perego *et al.*, 2003; Farag *et al.*, 2006; Mariotto, 2007), embora outros voláteis como 3-metil butanal, 2,3-butanediol, acetato de etila, 3-metil 1-butanol, 2-metil 1-butanol, 2,5-dimetilpirazina, entre outros, também sejam citados como produzidos por essas bactérias (Leejeerajumnean *et al.*, 2001; Farag *et al.*, 2006).

Por outro lado, a busca por soluções para redução de custos de processos biotecnológicos e a necessidade de satisfação de requisitos de ordem ambiental tem levado a uma grande diversidade de estudos para o aproveitamento de resíduos agroindustriais. Embora de modo relativamente restrito, a produção de compostos de aroma em manipueira, um resíduo da industrialização da farinha mandioca, também é mostrada na literatura. Estes trabalhos estão concentrados em síntese *de novo* (Damasceno *et al.*, 2003), onde compostos contendo C e N são transformados

através do metabolismo secundário microbiano em compostos de aroma, e como meio para produção de biomassa em processos de biotransformação, onde a adição de um substrato a um meio de cultura ou sistema de biocatálise permite que haja uma transformação bioquímica desse composto (Maróstica Jr. e Pastore, 2007; Maróstica Jr. *et al.*, 2006). Essa possibilidade decorre do fato de que a manipueira é rica em diversos nutrientes importantes no desenvolvimento dessas linhagens (Maróstica Jr e Pastore, 2007; Barros *et al.*, 2008). Do mesmo modo, muitos trabalhos têm descrito a produção de diversos bioprodutos por *Bacillus subtilis* em diversos resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactantes (Barros *et al.*, 2008), enzimas, entre outros bioprodutos (Barros *et al.*, 2011).

Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar por HD-SPME, GC-MS e GC-FID os compostos voláteis produzidos por *Bacillus subtilis* linhagem LB5a concomitante à produção de biossurfactante em manipueira e, desse modo, identificar os compostos voláteis majoritários e realizar uma quantificação dos mesmos. Além disso, esse trabalho teve também como objetivo estudar a cinética de produção desses voláteis bem como observar se há alguma relação com o crescimento celular e de uso de substrato.

2. Material e Métodos

2.1. Substrato

A manipueira usada nos experimentos foi recolhida em uma fábrica localizada no município de Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, Brasil. Para isso, a manipueira recém extraída da mandioca variedade IAC-13 foi acondicionada sob refrigeração e encaminhada para câmara frigorífica onde permaneceu armazenada a -18 °C para posterior uso. A manipueira foi descongelada, aquecida até fervura, resfriada a 5 °C e centrifugada a $1,6 \cdot 10^3$ g por 20 minutos. Após esse processo, a mesma foi chamada de manipueira tratada. Em seguida, a manipueira tratada foi acondicionada na cuba do biorreator e esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

2.2. Preparo do inóculo

Uma cultura de *Bacillus subtilis* identificada como LB5a pertencente à coleção do Laboratório de Bioaromas (DCA/FEA/UNICAMP) foi alçada a partir de colônias crescidas em placas de Agar Nutriente por 24 horas para Caldo Nutriente e incubado a 30 °C, sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Após incubação, foi realizada a leitura da densidade ótica na faixa de 660 nm para padronização com meio de cultura estéril. Utilizou-se um inóculo com absorbância de 0,5, que representou em análises microbiológicas realizadas concomitantemente, uma concentração de aproximadamente $3 \cdot 10^8$ UFC·mL⁻¹.

2.3. Processo fermentativo em batelada e amostragem

As fermentações foram realizadas em fermentador de bancada de 3,0 L de capacidade com 1,5 L de substrato tratado e esterilizado conforme descrito anteriormente. As condições de operação foram: temperatura, agitação e aeração mantidas em 30 °C, 100 rpm e 1 vvm, respectivamente. Para o início da fermentação foi adicionado 100 mL do inóculo no meio de cultura. Antes do início do processo, foi instalado na parte superior da cuba do biorreator um tubo coletor de silicone estéril por onde ocorria a saída da espuma formada durante a fermentação. Este tubo, por sua vez, estava acoplado a um frasco de colapso e acúmulo de espuma mantido à temperatura ambiente (Costa, 2005; Barros *et al.*, 2008).

Foi acoplado na saída da aeração do fermentador um aparato específico para coleta dos voláteis por microextração em fase sólida (SPME) em *headspace* dinâmico (HD) (figura 1). Em intervalos aproximados de 6 horas nas primeiras 36 horas de processo e, a partir de então, a intervalos aproximados de 12 horas, foi realizada a extração dos compostos voláteis arrastados pelo gás proveniente da espuma colapsada. Para a extração foi utilizada uma fibra de SPME CAR/PDMS (75 µm) sob as seguintes condições: temperatura de extração 30 °C (similar à temperatura do fermentador) por 30 minutos e sob vazão média de ar 10 mL·min⁻¹.

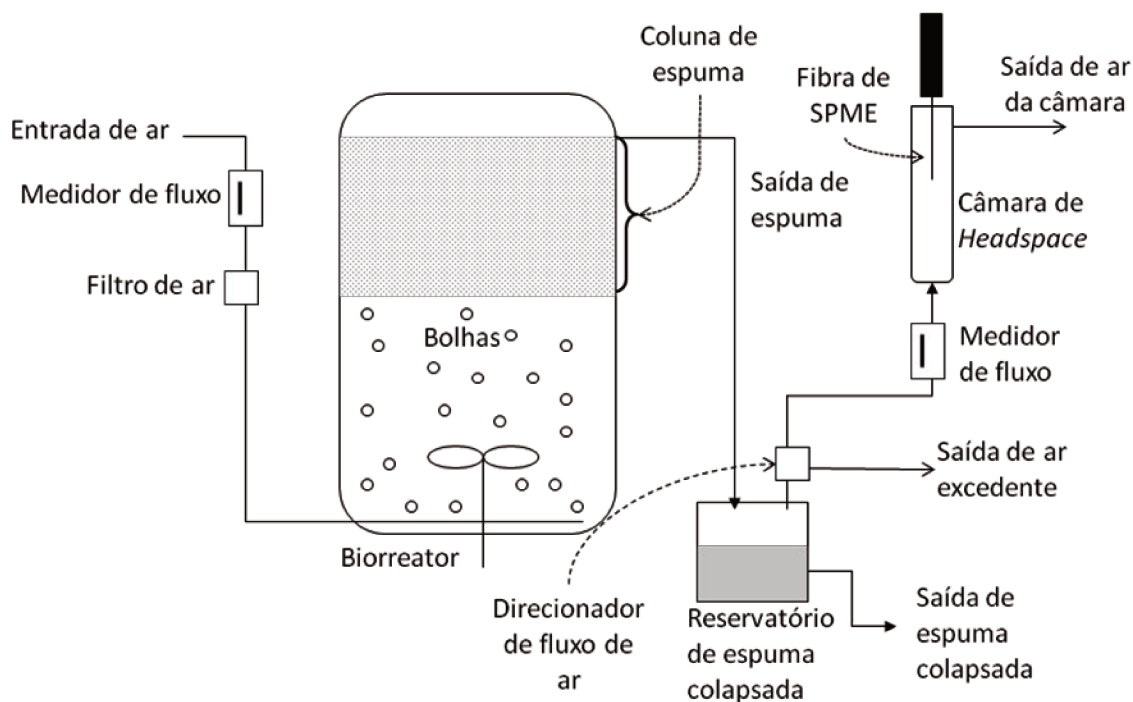


Figura 1. Esquema do sistema integrado de fermentação em batelada de manipueira por *Bacillus subtilis* e aparato de recuperação primária de biossurfactante (adaptado de Barros *et al.*, 2008) e de amostragem de voláteis (adaptado de Payne *et al.*, 2002).

2.4. Processo fermentativo em batelada alimentada

O processo fermentativo inicial foi idêntico ao de batelada. Contudo, após a queda na taxa de crescimento microbiano, foi adicionada manipueira tratada estéril com o auxílio de uma bomba peristáltica a uma vazão de $0,45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, o que resultou em uma taxa de diluição D de $0,02 \text{ h}^{-1}$. Foi realizada também amostragem dos voláteis produzidos na fermentação alimentada utilizando-se os mesmos procedimentos e aparatos descritos para o processo em batelada.

2.5. Quantificação e identificação dos voláteis

Após extração, a fibra de SPME foi imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos voláteis. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar com ionização por elétrons (Shimadzu QP-5000), sob as seguintes condições cromatográficas: injetor a 260 °C, tempo de dessorção 1 min; coluna: HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d. X 0,25 µm, JeW Scientific, USA); gás de arraste: Hélio com vazão de 1 mL.min⁻¹; programação de temperatura: início a 40 °C, com taxa de elevação em 3 °C.min⁻¹ até atingir 100 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 minutos, interface a 240 °C; EI de +70 eV; 35-350 m/z. A identificação foi feita com base nos tempos de retenção comparados aos padrões além da comparação dos espectros de massa obtidos com padrões e com a base de dados NIST 2005 de espectros de massa com similaridade maior que 90%. Para quantificação, o mesmo aparato cromatográfico foi utilizado, contudo, associado a um detector de ionização em chama (FID). Uma curva de calibração externa foi construída usando-se os padrões dos voláteis estudados no qual uma determinada área de picos foi associada a determinada concentração dos compostos em mg.mL⁻¹.

3. Resultados e discussão

3.1. Voláteis da manipueira tratada

Os principais compostos voláteis presentes na manipueira tratada e esterilizada no momento inicial da fermentação (0 h) e estão descritos na tabela 1. De modo geral, considerando tratem-se de produtos de natureza bastante diferente, os compostos apresentam semelhança com os encontrados por Dougan *et al.*, (1983), que reportou um predominância numérica de hidrocarbonetos e aldeídos para mandioca crua e alcoóis, aldeídos e cetonas para farinha. Adicionalmente, no trabalho de Sayaslan *et al.*, (2000) foi encontrado em amido de mandioca uma

predominância em áreas dos picos de álcoois (majoritariamente o 2-propanol) e hidrocarbonetos, seguidos por ésteres e aldeídos. Conforme destacado por Dougan *et al.*, (1983), o número de voláteis na mandioca crua é menor que na processada. Consequentemente, uma grande fração dos compostos voláteis encontrados nos derivados foi formada majoritariamente durante o processo. Aldeídos e cetonas são formados pela reação de Maillard e degradação de Strecker durante o cozimento, embora também possam decorrer de fermentações. O mesmo fenômeno deve acontecer na manipueira tratada visto que a mesma passa por dois processos de aquecimento: uma fervura, como etapa inicial do preparo do meio, e uma autoclavagem imediatamente antes da fermentação.

Tabela 1. Principais compostos voláteis avaliados por HD-SPME, GC-MS e GC-FID dentre os produzidos por *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira.

Tempo de retenção (min)	Compostos	Índice de retenção (IR)
1,908	2-Propanol	477
1,992	Acetona	500
2,217	TR:2.217 ⁽¹⁾	562
2,325	TR:2.325 ⁽¹⁾	591
2,367	Acetato de etenila (acetato de vinila)	601
2,417	2-Butanona	607
2.533	Acetato de etila	621
2.633	TR:2.633 ⁽¹⁾	633
2.875	3-metil-Butanal	661

Nota: (1) Os compostos não identificados não apresentaram similaridade com espectros da base de dados NIST 2005, deste modo, são apresentados apenas em termos de tempo de retenção (RT).

A concentração dos compostos naturalmente encontrados na manipueira tratada foi reduzida ao longo do processo, pois os mesmos foram arrastados do meio pelo gás sem reposição por parte do desenvolvimento microbiano. Essa depleção foi perceptível na segunda análise de voláteis, realizada depois de 6 horas do início da fermentação, bem como nas consecutivas.

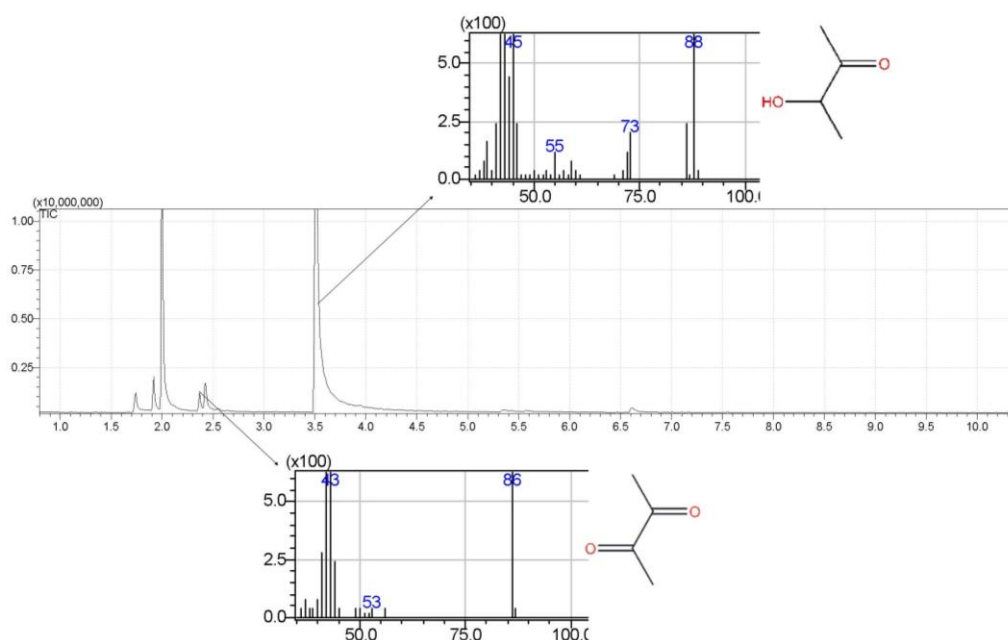


Figura 2. Cromatograma do extrato capturado através da técnica HD-SPME onde estão destacados os espectros da acetoína (acima) e diacetil (abaixo) em manipueira fermentada por *Bacillus subtilis* LB5a.

3.2 Voláteis produzidos e sua cinética durante a fermentação em batelada

A partir das primeiras horas da fermentação houve uma alteração nos principais constituintes da fração volátil. Além da redução dos voláteis da manipueira, houve, simultaneamente, a identificação da formação de diacetil e acetoína (figura 2), analitos que, no início da fermentação (0 h), não estavam presentes. A partir das primeiras amostragens (6 h) foi identificada a presença dos dois compostos.

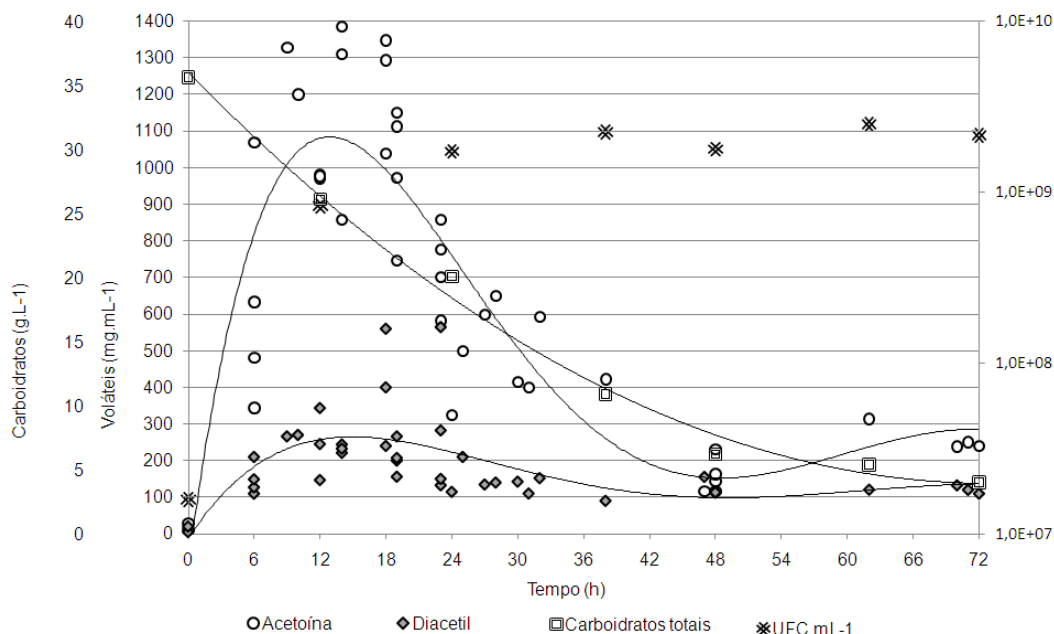


Figura 3. Estimativas de concentração de acetoína, diacetil, média açúcares totais e média de contagem de unidades formadoras de colônia ao longo do processo fermentativo em batelada realizado por *Bacillus subtilis* LB5a em maniveira.

No caso da acetoína, houve uma intensa elevação dos valores de áreas dos picos cromatográficos até o período compreendido entre 12 e 18 horas, período no qual a acetoína atingiu sua concentração máxima. A partir de então seus valores foram reduzindo até 48 horas, mantendo então um patamar até o final do processo fermentativo. Para o diacetil, a elevação foi menos intensa, tendo como resultados concentrações inferiores às encontradas para acetoína. Assim, como no caso da acetoína, os valores de áreas dos picos cromatográficos de diacetil subiram gradualmente até 18 horas, momento em que se iniciou um decréscimo para níveis menores, sendo mantidos então os mesmos níveis até o final da fermentação.

Esse comportamento mostra que boa parte da acetoína foi produzida e liberada juntamente com a saída de ar no período entre 12 e 24 horas, período aproximado do alcance da fase de estabilidade na contagem microbiana. Essa cinética permite a inferência de uma possível correlação entre a redução da taxa crescimento exponencial e a elevação da taxa de produção indicada pela captura

dos mesmos pelo sistema DH-SPME (figura 1). Com o avanço da fase estacionária, houve uma redução da taxa de crescimento microbiano, o mesmo ocorreu com a síntese destes voláteis. Paralelamente, verificou-se que a produção destes foi mais intensa quando fontes de carbono, determinado em função do teor açúcares totais no meio fermentativo, estavam bastante reduzidas quando comparadas ao início da fermentação, mostrando uma possível rota de metabolismo secundário.

Embora a produção de acetoína seja maior, não se pode afirmar que sua importância também seja maior, pois ambos possuem características sensoriais semelhantes. No entanto, o *threshold* do diacetil é bem menor que a o da acetoína, em bebidas alcoólicas, por exemplo, enquanto o limite de detecção da acetoína vai de 80 a 150 mg·L⁻¹, no diacetil os valores vão de 0,1 a 2,8 mg·mL⁻¹ (Ehsani *et al.*, 2009). Inclusive, por esse motivo, é preferido como aditivo alimentar (Berger, 1995). Adicionalmente, a formação de pequenas quantidades de diacetil por oxidação da acetoína pode dar a esta maior importância para o aroma do que o seu flavor, por si mesmo (Carvalho, 1999). Outra importante limitação neste caso está no fato de que a técnica do SPME está baseada não apenas no equilíbrio entre as moléculas que estão adsorvidas às fibras, mas também há um equilíbrio dinâmico entre as que estão no líquido e na fase gasosa, ou seja, fatores como ponto de ebulição elevados grande afinidade com água (que são característicos do 2,3-butanediol) e grande presença de sólidos solúveis e insolúveis no meio de cultura (que é características do meio de cultura empregado) interferem nesse equilíbrio (Ji *et al.*, 2011).

Desse modo, considerando os dados encontrados e tendo em vista um objetivo de aproveitamento comercial dos mesmos, três fatos são de elevada importância: i) esses compostos são arrastados pelo ar que é obrigatoriamente insuflado no sistema não necessitando, portanto, de nenhum aparato adicional o uso de insumo de qualquer natureza para a recuperação primária; ii) sua maior produção ocorre nas primeiras horas de fermentação permitindo que os sistemas de captação desses voláteis, incluído aparatos e/ou insumos e/ou solventes, fossem usado em apenas uma fração do total de tempo do processo fermentativo; iii) nenhuma perturbação e/ou prejuízos e/ou alterações seriam acrescentados ao processo fermentativo em questão.

3.3 Cinética de produção de voláteis em fermentação em batelada alimentada

Considerando a influência das taxas de crescimento e concentração de açúcares, foram realizados experimentos de fermentação em batelada alimentada. Logo após o começo da alimentação, 20 horas depois do início da fermentação, houve um incremento da concentração de voláteis provenientes da manipueira, enquanto os compostos-alvos deste estudo apresentaram, um decréscimo, conforme esperado. Contudo, essa diminuição quando novo meio de cultura estéril era adicionado ao sistema, foi bastante intensa, sendo superior inclusive ao fator de diluição (D), que foi de $0,02 \text{ h}^{-1}$. Após o fim da alimentação, a cinética dos voláteis voltou a ter o mesmo comportamento do sistema em batelada, no qual ocorre uma elevação acentuada seguida de posterior redução. Isto pode implicar em limitações de processo contínuo ou de batelada alimentada.

Este comportamento permitiu-nos inferir que a biossíntese dos dois voláteis em questão pode estar estreitamente ligada à concentração de nutrientes, especialmente os carboidratos que são as fontes de carbono predominantes na manipueira. Essa dedução é corroborada pelo fato de que, na maioria das bactérias, a acetoína é formada a partir do piruvato e é, portanto, um produto do metabolismo de carboidratos. Por sua vez, o diacetil é formado a partir da descarboxilação do alfa-acetolactato, embora existam incertezas quanto a rota metabólica correta, tanto podendo ser a citada acima como pela ação de uma diacetil-sintase (Carvalho, 1999). Hugenholtz e Starrenburg (1992) confirmam que o diacetil é produzido por descarboxilação oxidativa do alfa-acetolactato, e Ramos *et al.* (1994) que mostraram que, caso exista uma diacetil sintase, essa é responsável por menos de 10% do diacetil produzido. López e Fortnagel (1972) destacam que a produção de acetoína, diacetil e butanediol são compostos normalmente liberados juntos por micro-organismos dessa espécie.

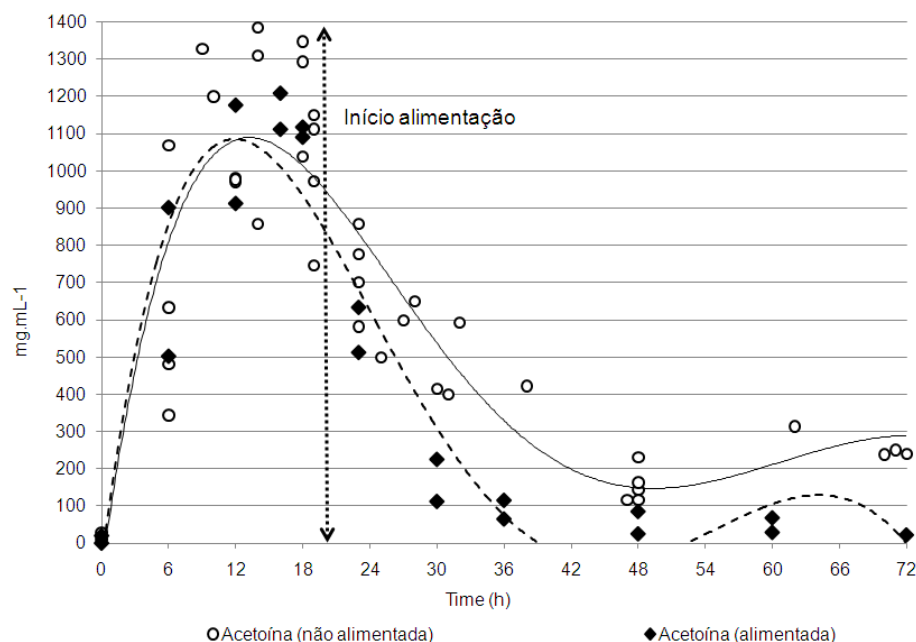


Figura 4. Comparação entre de concentração de acetoína longo do processo fermentativo em batelada e em batelada alimentada (a partir de 20 horas) realizado por *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira.

Perego *et al.* (2003) demonstraram, usando linhagens de *Bacillus licheniformis*, que o amido hidrolisado apresentava maiores concentração e produtividade de acetoína quando comparado a meios formulados com glicose e sacarose. Os autores sugerem, inclusive, que pode haver a produção de algum composto pelo aquecimento e hidrólise enzimática do substrato que estimule a produção de diacetil e acetoína pala linhagem estudada, sendo desnecessária, portanto, a adição de um fator adicional de crescimento.

Adicionalmente, entre as vantagens do processo, está o fato de que os voláteis estudados poderiam ser recuperados do sistema sem grandes alterações dos parâmetros ou aparatos já usados nas fermentações para produção de biossurfactante (Barros *et al.*, 2008) sem nenhuma alteração do tecnologia em si, apenas com o recolhimento do fluxo de ar saído do reservatório de espuma colapsada.

4. Conclusão

Com este trabalho pode-se concluir que é possível o aproveitamento do resíduo agroindustrial manipueira para a produção 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) e butanodiona (diacetil) a partir do processo fermentativo em biorreator com cultura de *Bacillus subtilis* previamente estabelecido, embora haja uma evidente limitação do processo em fermentações em batelada alimentada e, possivelmente, na contínua. Adicionalmente, foi constatado que a produção máxima destes compostos se dá a partir do fim da fase de crescimento exponencial e com o esgotamento das fontes de carbono da manipueira.

5. Referências Bibliográficas

Antinone, M. J.; Lawless H. T.; Ledford, R. A.; Johnston, M. Diacetyl as a flavor component in full fat cottage cheese. *J. Food Sci.* **1994**, 1, 38-42.

Barros, F. F. C.; Ponezi, A. N.; Pastore, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* **2008**, 35, 1071-1078.

Berger, R. G. Aroma Biotechnology 1st. ed.; Springer- Verlag: Berlin, Germany, **1995**, pp. 1-239.

Bicas, J. L.; Silva, J. C.; Dionísio, A. P; Pastore, G. M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2010**, 30, 7-18.

Carvalho, J. C. Produção de diacetil e acetoína: *Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*. Dissertação de Mestrado; Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, Brasil, **1999**. pp 1-100.

Costa, G. A. N. Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas: Campinas, Brasil, **2005**. pp 1-87.

Damasceno, S.; Cereda, M. P.; Pastore, G. M.; Oliveira, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. *Process Biochem.* **2003** 39, 411-414.

Dougan, J.; Robinson, J. M.; Sumar S., George E. Howard, D. G. Coursey. Some flavouring constituents of cassava and of processed cassava products. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, 34, 874-884.

Ehsani, M.; Fernández, M. R.; Biosca, J. A.; Julien, A.; Dequin, S. Engineering of 2,3-Butanediol Dehydrogenase To Reduce Acetoin Formation by Glycerol-Overproducing, Low-Alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environm. Microbiol.* **2009**, 75, 3196-3205.

Farag, M. A.; Ryu, C-M.; Sumner, L. W.; Pare, P. W. GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry.* **2006**, 67, 2262–2268.

Hugenholtz J.; Starrenburg, M. J. C. Diacetil production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, 38, 17-22.

Ji, X-J.; Huang, H.; Ouyang, P-K. Microbial 2,3-butanediol production: a state of art review. *Biotechnol. Adv.* **2011**, 29, 351-364.

Leejeerajumnean, A.; Duckham, S. C.; Owens, J. D.; Ames, J. M. Volatile compounds in *Bacillus*-fermented soybeans. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 81, 525-529.

López, J.; Fortnagela, P. The regulation of the butanediol cycle in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1972**, 279, 554-560.

Mariotto, J. R. *Produção de acetoína e 2,3-butanodiol por Bacillus polymyxa*. Dissertação de Mestrado; Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, Brasil, **2007**, pp 1-75.

Maróstica Jr, M. R.; Pastore, G. M. Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. **2006**, 26, 690-696.

Maróstica Jr, M. R.; Pastore, G. M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chem*. **2007**, 101, 345-350.

Martins, F. M. *Estudo do processo de encapsulação do bioaroma de gongorzo em β -ciclodextrina e em lipossomas*. Dissertação de Mestrado; Universidade Estadual de Campinas: Campinas, Brasil, **2003**, pp.174.

Owens, D.; Allagheny, N.; Kipping, G.; Ames, J. M. Formation of volatile compounds during *Bacillus subtilis* fermentation of soya beans. *J. Sci. Food Agric*. **1997**, 74, 132-140.

Payne, R.; Puchalski, A.E.; Labows, J. SPME Applications in consumer products flavor, fragrance and odor analysis In: Flavor, fragrance and odor analysis; Marsili R. Ed.; Marcel Dekker: New York, NY, **2002**, pp. 277-296.

Perego, P.; Converti, A.; Del Borghi, M. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresour. Technol*. **2003**, 89, 125-131.

Ramos A.; Jordan K.; Cogan, T. M.; Santos, H. ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 6, 1739-1748.

Sayaslan, A.; Chung, O. K.; Seib, P. A.; Seitz, L. M. Volatile compounds in five starches. *Cereal Chem.* **2000**, 77, 248–253.

Serebrennikov, V. M. Effects of temperature on the biosynthesis of 2,3-butanediol and acetoin under varying conditions of batch culturing of *Bacillus polymyxa* CCM 1465. *Appl. Biochem. Microbiol.* **1995**, 31, 537-542.

Capítulo 6: Coprodução de enzimas, aromas e biossurfactantes por *Bacillus subtilis* em manipueira²

1. Introdução

Em uma célula viva existe uma multiplicidade de moléculas sintetizadas por inúmeras vias bioquímicas. Contudo, nos processos fermentativos convencionais, algumas dessas vias são alteradas por métodos clássicos, ou seja, modificação do meio de cultura, das condições de fermentação, adição de indutores, seleção de linhagens de maior potencial produtivo, entre outros, ou métodos genéticos. Apesar da diversidade de estratégias, em todos esses casos há o favorecimento e/ou estímulo da síntese de determinado composto sem maiores monitoramento ou aproveitamento dos demais (Buckland e Lilly, 1993; Schallmey *et al.*, 2004; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Bicas *et al.*, 2008). Não obstante, mesmo havendo esse direcionamento, as células continuam produzindo a maioria dos compostos normalmente sintetizados.

Por outro lado, a redução dos custos de produção é um dos objetivos industriais primordiais (Bicas, *et al.*, 2010). A coprodução pode ser uma dessas estratégias, pois permite a produção simultânea de dois ou mais bioprodutos numa mesma fermentação. Essa técnica pode ser atrativa economicamente, pois os custos dos meios de cultura e dispêndio energéticos com a fermentação seriam minimizados. Além disso, pode ser ambientalmente correta por permitir um melhor aproveitamento de materiais e energia. Outra vantagem está na possibilidade de

² Este capítulo trata de forma conjunta o objeto de estudo dos anteriores, especialmente os capítulos 3, 4 e 5. Contudo, os dados aqui contidos não são mera repetição, pois foram realizados alguns novos experimentos para confirmação dos resultados anteriores, além de alguns experimentos e análises adicionais. Objetivo do mesmo é o agrupamento de todos em um mesmo processo tal como um dos objetivos centrais desse trabalho.

direcionamento da produção para um ou outro componente em função de custos ou do valor de mercado dos produtos.

Alguns estudos mostram diferentes processos com coprodução de bioprodutos por diferentes micro-organismos como bolores (Bicas, Quadros *et al.*, 2010), leveduras (Lin, *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2008) e bactérias (Hyun e Zeikus, 1985; Maddox *et al.*, 1995; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007) como viáveis ou potencialmente viáveis a curto e médios prazos. Entre esses trabalhos são relatadas a produção simultânea de: diferentes enzimas (Hyun e Zeikus, 1985; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007), enzimas e biossurfactantes (Martins *et al.*, 2008), enzimas e aromas (Bicas, *et al.*, 2010). Além disso, são mostrados processos fermentativos associados ao aproveitamento de resíduos subprodutos agroindústrias (Martins *et al.*, 2008, Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Coraucci-Neto, 2008; Bicas, *et al.*, 2010).

O *Bacillus subtilis* é reconhecidamente um bom produtor de diversos compostos de interesse industrial como enzimas, proteínas heterólogas, nucleotídeo purínicos, inseticidas, vitaminas, antibióticos, biossurfactantes entre outros (Schallmey *et al.*, 2004; Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Barros *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção e respectivas cinéticas de biocompostos por *Bacillus subtilis*, mais especificamente biossurfactantes, enzimas e aromas, em uma fermentação em batelada realizada em biorreator de bancada tendo a manipueira como substrato. Sendo que a linhagem estudada foi identificada previamente como produtora de lipopeptídios biossurfactantes.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras e tratamento do substrato

A manipueira usada nos experimentos foi recolhida em uma fábrica de farinha localizada em Santa Maria da Serra, estado de São Paulo, Brasil. O resíduo foi exclusivamente obtido pela prensagem da mandioca lavada, descascada e triturada.

A manipueira recém extraída foi acondicionada sob refrigeração e encaminhada para câmara frigorífica onde permaneceu armazenada a -18 °C. No momento do uso foi então descongelada, aquecida até fervura, resfriada a 5 °C e centrifugada na mesma temperatura a $1,6 \cdot 10^3$ g por 20 minutos. Após esse processo, a mesma foi chamada de manipueira tratada. Em seguida a manipueira tratada foi acondicionada na cuba de um biorreator onde foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

2.2. Preparo do inóculo

Foi usada uma cultura de *Bacillus subtilis* identificada como LB5a pertencente à coleção do Laboratório de Bioaromas (DCA/FEA/Unicamp). O inóculo foi preparado a partir de colônias crescidas por 24 horas em placas de Ágar Nutriente e transferidas com alça de platina para Caldo Nutriente onde foi incubado a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Após incubação, foi realizada a leitura de densidade ótica na faixa de 660 nm para padronização com meio de cultura estéril. Utilizou-se um inóculo com absorvância de 0,5, com uma concentração de, aproximadamente, $3 \cdot 10^8$ UFC·mL⁻¹.

2.3. Aparatos de fermentação

Antes do início do processo, foi instalado na parte superior da cuba do biorreator um tubo coletor de silicone estéril por onde ocorria a saída da espuma formada durante a fermentação. Este tubo, por sua vez, estava acoplado a um frasco de colapso e acúmulo de espuma mantido à temperatura ambiente (Barros *et al.*, 2008).

Adicionalmente, foi acoplado na saída do fluxo de ar do frasco de colapso de espuma um aparato específico para coleta dos voláteis por microextração em fase solida (SPME) em *headspace* dinâmico (HD) (figura 1).

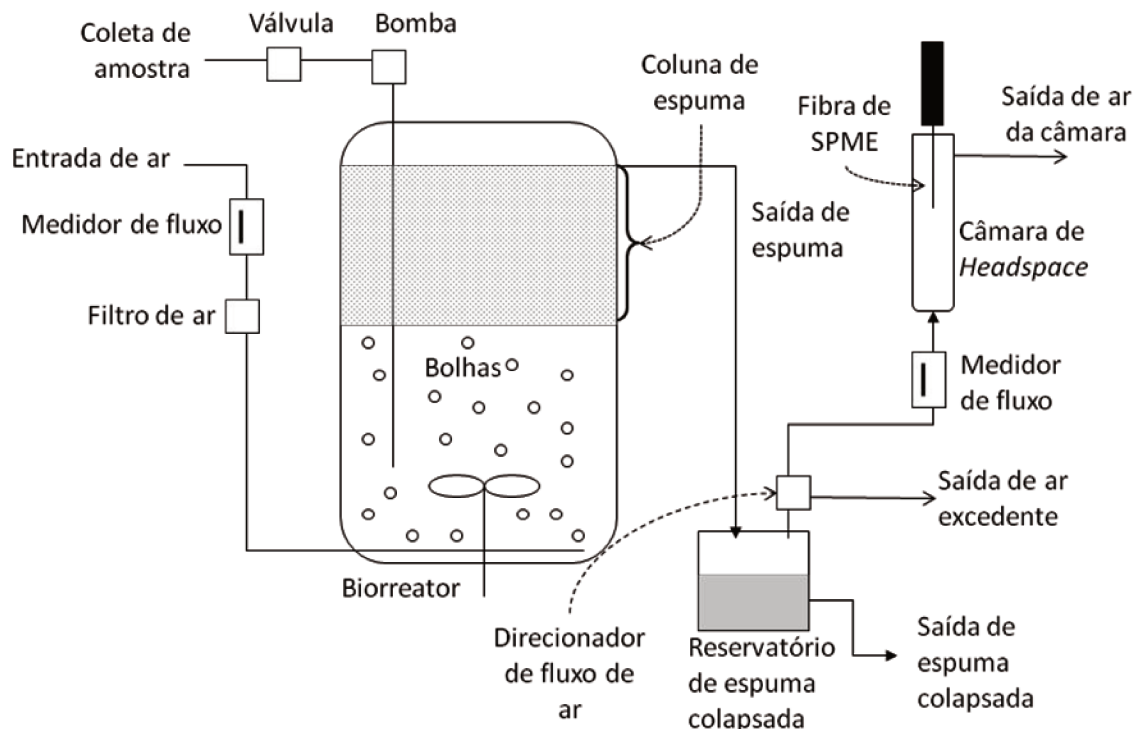


Figura 1. Esquema do sistema integrado de fermentação em batelada de manipueira por *Bacillus subtilis* e aparatos de amostragem de meio fermentado e de recuperação primária de biossurfactante (adaptado de Barros *et al.*, 2008) e de amostragem de voláteis (adaptado de Payne *et al.*, 2002).

2.4. Processo fermentativo e amostragem

As fermentações foram realizadas em fermentador de bancada com cuba de 3,0 L de capacidade total com 1,5 L de manipueira tratada e esterilizada. Para o início da fermentação foi adicionado 100 mL do inóculo padronizado. As condições de operação foram: temperatura, agitação e aeração mantidos em 30 °C, 150 rpm e 1vvm, respectivamente.

A partir do momento inicial (0 hora) e a cada 12 horas foram recolhidas amostras do meio de cultura com as quais foram monitorados a atividade superficial, pH e contagem padrão em placas do meio de cultura (Barros *et al.*, 2008), além da atividade enzimática. A primeira coleta de espuma liquefeita ocorreu após 24 horas do início da fermentação, seguido por coletas sucessivas feitas em intervalos de 12

horas coincidentes aos da retirada de amostra do biorreator. Posteriormente, a espuma liquefeita, teve seu volume e pH medidos, além de medidas de TS, CMD⁻¹ e CMD⁻² (Barros *et al.*, 2008), além da análise de atividades enzimáticas amilolítica, proteolítica e lipolítica.

Paralelamente, em intervalos não sincronizados com a amostragem de meio de cultura, foram realizadas as extrações dos compostos voláteis produzidos durante a fermentação. Para isso foi usada uma fibra de SPME CAR/PDMS (75 µm) sob as seguintes condições: temperatura de extração de 30 °C por 30 minutos e vazão média de 10 mL.min⁻¹.

2.5. Purificação do biossurfactante

A purificação do biossurfactante foi realizada através dos seguintes procedimentos: inicialmente, a espuma colapsada foi centrifugada a $1,6 \cdot 10^3$ g por 10 minutos para eliminação de células, o sobrenadante teve seu pH ajustado para 2,0 com solução 2,0 N de HCl e mantido sob repouso por 12 horas a 5 °C para decantação. Posteriormente, o líquido foi novamente centrifugado a $1,6 \cdot 10^3$ g por 10 minutos e o precipitado recolhido e neutralizado com solução 1,0 N de NaOH e seco a 50 °C com circulação forçada de ar (Makkar *et al.*, 1999). Em seguida, o sólido, aqui denominado de “surfactante bruto”, foi pesado, triturado e misturado a uma solução de clorofórmio e metanol 65:15 (v:v) e filtrado em papel de filtro. O permeado foi seco a 50 °C com circulação forçada de ar (Makkar *et al.*, 1999; Barros *et al.*, 2008). Finalmente, o sólido obtido foi chamado de “biossurfactante semipurificado”, sendo então pesado, triturado e armazenado sob congelamento.

2.6. Análises

2.6.1. Atividade superficial

As amostras de meios de cultura fermentados e espumas foram previamente clarificadas por centrifugação a $1,6 \cdot 10^3$ g por 10 minutos. Em seguida, foram

realizadas medidas de tensão superficial (TS) do sobrenadante e de suas diluições em água destilada nas seguintes proporções: 1:10 (v/v) ou diluição micelar crítica 1/10 (CMD⁻¹), e 1:100 (v/v) ou diluição micelar crítica 1/100, (CMD⁻²) (Barros *et al.*, 2008). As medições foram feitas em tensiômetro modelo K12 (A. KRÜSS Optronic GmbH, Alemanha) usando o método da placa (Barros *et al.*, 2008) em 10 repetições e desvio de 0,2. A verificação da concentração micelar crítica (CMC) foi realizada através da medida da tensão superficial de diluições seriadas de uma solução de 1mg/ml do biossurfactante semipurificado. Em seguida, foi identificado o ponto de inflexão da curva de tensão superficial *versus* concentração do biossurfactante de acordo com Sheppard e Mulligan (1987) e Barros *et al.* (2008).

2.6.2. Microbiologia

As amostras dos meios de cultura fermentados tiveram suas contagens de células viáveis realizadas através das diluições seriadas das mesmas em solução de peptona de caseína 1% (m/v). A seguir, as diluições foram distribuídas em placas de ágar nutriente pela técnica do espalhamento em superfície, sendo então incubadas a 35 °C por 24 horas e lidas em seguida (Barros *et al.*, 2008).

2.6.3. Quantificação e identificação dos voláteis

Após extração, a fibra de SPME CAR/PDMS foi imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo para dessorção dos voláteis. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar com ionização por elétrons (Shimadzu QP-5000), sob as seguintes condições cromatográficas: injetor 260 °C, tempo de dessorção de 1 minuto *splitless*; coluna: HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d. X 0,25 µm, JeW Scientific, USA); gás de arraste: hélio com vazão de 1 mL.min⁻¹; programação de temperatura: início a 40 °C, com taxa de elevação em 3 °C.min⁻¹ até atingir 100 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 minutos, interface a 240 °C; EI de +70 eV; 35-350 m/z. Para quantificação, o mesmo aparato cromatográfico, contudo

associado a um detector de ionização de chamas. Além disso, foi feita uma curva de calibração com os compostos-alvos.

2.6.4. Medida de atividade enzimática

Antes das medições foi preparado um extrato enzimático. Para isso, as amostras do fermentador e da espuma foram centrifugadas na velocidade máxima em centrífuga de eppendorf a $3,9 \cdot 10^3$ g por 5 minutos para a remoção das células, sendo o sobrenadante usado nas análises.

Para a medição da atividade proteolítica, foi avaliada a capacidade do extrato em hidrolisar uma solução de caseína 1,2% (p/v), pH 7, foi analisada em espectrofotômetro. Para cada grupo de análise foi feito um branco no qual o extrato foi substituído por água destilada. A atividade enzimática foi feita com uma curva padrão com tirosina equivalente (Macedo *et al.*, 2005). Para atividade amilolítica, foi avaliada a capacidade do extrato em hidrolisar uma solução de amido solúvel 1,0 % (p/v), pH 7, sendo analisada em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a redução de 0,1 mg de amido em 10 minutos de reação por 0,5 mL de enzima (Syu e Chen, 1997). Para atividade lipolítica, foi avaliada a capacidade do extrato em hidrolisar os triacilgliceróis de emulsão 25% (v/v) de óleo de oliva em goma arábica 7% (m/v), sendo analisada através de titulação com NaOH 0,05 M usando 20 µL de fenolftaleína (0,5 % em etanol) como indicador. Uma unidade de lipase (1U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um µmol de ácido graxo por minuto ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$), nas condições descritas acima (Prazeres, 2006).³

3. Resultados e discussão

Para a execução de um sistema de co-produção, é necessário o conhecimento do comportamento do processo fermentativo de forma que seja possível seu controle assim como sua orientação para que os resultados esperados

³ A metodologia está mais detalhadamente descrita em Material e Métodos do capítulo 4.

sejam satisfatoriamente alcançados. Entre as características que devem ser conhecidas estão as possíveis correlações entre a cinética de desenvolvimento microbiano e a produção e/ou produtividade para cada produto-alvo. Desse modo, em cada fermentação foram avaliadas simultaneamente a cinética da fermentação e a produção de compostos de interesse. Assim, foi monitorada a atividade enzimática no meio de cultura para produção e arraste de compostos voláteis pelo ar insuflado no sistema e a produção de biossurfactante recolhida através da coleta de espuma foram monitorados nesse estudo.

3.1. Dados gerais da cinética da fermentação⁴

O acompanhamento da cinética do processo foi realizado considerando os seguintes aspectos: contagem microbiana, pH e tensão superficial do meio de cultura.

Os valores médios de contagem microbiana apresentaram elevação acentuada entre 0 e 12 horas, partindo de valores um pouco abaixo de 10^8 UFC·mL⁻¹, até chegar a valores ligeiramente inferior a 10^{10} UFC·mL⁻¹, o que caracteriza esse período como fase de crescimento exponencial. Por volta de 24 horas, as contagens atingiram a fase estacionária, permanecendo assim até o fim da fermentação (figura 2). O pH do meio de cultura também aumentou, sendo que esse aumento foi maior nas primeiras 12 horas com ligeira elevação no restante do processo. A fase de maior elevação do pH coincidiu com a fase de crescimento exponencial, mostrando haver uma forte associação entre essas características. Os valores de pH na espuma foram semelhantes aos do meio de cultura para cada período analisado.

A tensão superficial (TS) do meio de cultura apresentou um intenso decréscimo nas primeiras 12 horas seguido de um aumento gradativo até atingir valores próximos aos iniciais entre 48 e 60 horas. As concentrações de biossurfactante no meio de cultura no momento de TS mínimo estavam próximas da

⁴ *Dados semelhantes para os parâmetros estudados foram encontrados no capítulo 3 e 5, desse modo uma discussão complementar pode ser encontrada nos referidos capítulos.*

CMC, pois a TS em torno de $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ era semelhante aos valores obtidos em soluções de biossurfactante semipurificado em concentração igual à CMC. A partir do momento que atingiram essa concentração, o biossurfactante foi então arrastado para fora do sistema à medida que foi sendo produzido, o que é evidenciado pela simultaneidade entre o início da elevação da TS e da produção de espuma.

Como descrito anteriormente (*capítulo 3*), esse comportamento está alinhado ao encontrados por Davis *et al.*, (2001) e Barros *et al.*, (2008), que demonstraram que a elevação da TS a partir desse momento está relacionada à extração do biossurfactante do meio de fermentação. Os resultados de TS do meio de cultura durante a fermentação variaram de 32 até $47 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A partir disso, e considerando o raciocínio anterior associado ao fato de que a CMC foi determinada em $11 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, e que a TS de uma solução na CMC está em torno de $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, é possível inferir que as concentrações de surfactante no meio foram sempre inferiores em pelo menos 10 vezes que as encontradas na espuma.

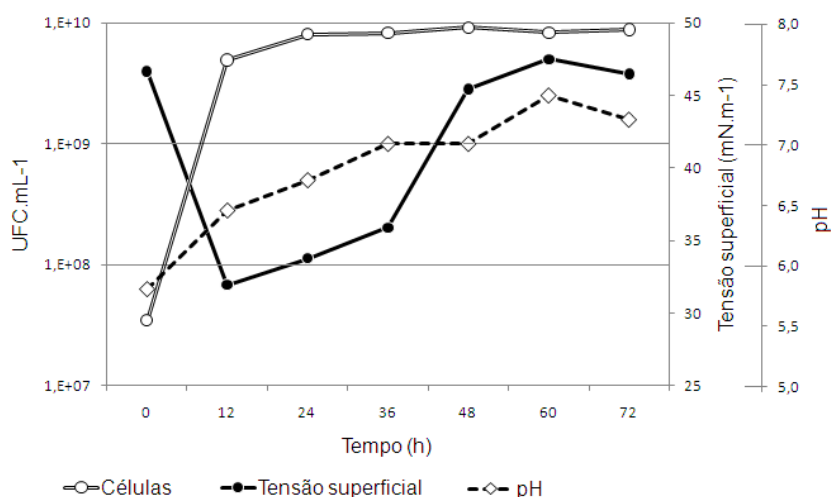


Figura 2: Cinética da contagem de células viáveis, tensão superficial e pH da manipuladora fermentada por *Bacillus subtilis*.

3.2. Produção de biossurfactante ^{5 6}

A cinética da produção de biossurfactante foi realizada considerando a quantidade de biossurfactante produzido por tempo de fermentação. Além disso, o volume de espuma também foi avaliado, pois, variações na quantidade e/ou cinética de produção dos compostos tensoativos resultaram em diferentes cinéticas e volume de produção de espuma. Derivado desses dois primeiros parâmetros foi obtido um terceiro: a concentração de biossurfactante na espuma. Esses dados são importantes, pois, além dos ganhos obtidos com a produtividade elevada, eles condicionam os métodos subsequentes de purificação.

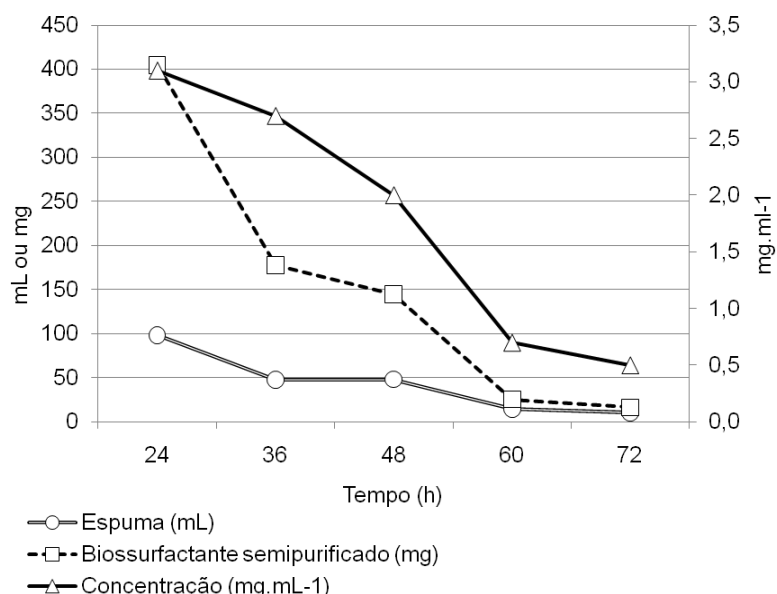


Figura 3: Cinética de volume de espuma de espuma recolhida, biossurfactante semipurificado e concentração de biossurfactante semipurificado por mililitro de espuma coletada.

⁵ Dados semelhantes para os parâmetros estudados foram encontrados no capítulo 3, desse modo uma discussão complementar pode ser encontrada no referido capítulo.

⁶ Um diferencial nesse caso foi a inclusão de uma etapa de purificação, ou seja, as concentrações foram feitas de forma direta ao contrário do capítulo supracitado.

A formação de espuma iniciou-se sempre a partir de 12 horas, sendo a primeira coleta realizada sempre com 24 h de fermentação. A maior taxa de produção de surfactante e de volume de espuma ocorreu nas primeiras horas da fermentação (figura 3), com valores de volume e de concentração descendente até 72 horas, quando houve o esgotamento do surfactante no meio. Isso corrobora os dados anteriores que mostra a elevação da TS do meio de cultura aos níveis iniciais (figura 2).

3.3. Compostos voláteis ⁷

A partir das primeiras horas da fermentação houve a identificação da formação de diacetil e acetoína (figura 4). A concentração desses compostos partiu de valores nulos no momento inicial, elevando-se já com 8 horas. Entre 12 e 16 horas, houve uma elevação acentuada das áreas dos picos de acetoína que atingiu ao final desse período seu máximo, a partir do qual recuaram até o final da fermentação. Para o diacetil, houve um comportamento semelhante, contudo a concentração subiu moderadamente.

Esse comportamento mostra que significativa parte da acetoína foi produzida e liberada no intervalo entre 12 e 24 horas, período coincidente com o fim da fase de crescimento exponencial. Paralelamente, verificou-se que a produção desta foi mais intensa quando fontes de carbono, determinadas em função do teor de açúcares totais no meio fermentativo, estavam próximas do esgotamento, mostrando uma possível relação com o metabolismo secundário microbiano.

⁷ *Dados semelhantes para todos os parâmetros foram encontrados no capítulo 5, desse modo uma discussão complementar pode ser encontrada no mesmo.*

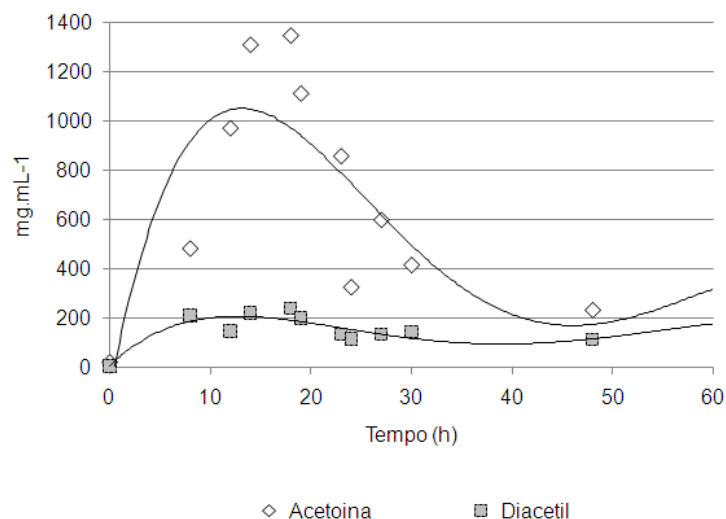


Figura 4. Cinética das médias das áreas dos picos de acetoina e diacetil do processo de fermentação da manipueira por *Bacillus subtilis*.

3.4. Atividade enzimática ^{8 9}

Além das medidas de atividade enzimática feita no meio de cultura, também foram realizadas medições na espuma eliminada do fermentador. Esse aspecto foi considerado importante, pois, neste caso, o sistema de recuperação primária do biossurfactante é baseado no princípio da coluna de bolhas, método usado em recuperações e purificações de outros compostos tensoativos (Perna, 2010) e enzimas (Prazeres *et al.*, 2006). Desse modo, são esperadas diferentes atividades entre a atividade encontrada no meio e na espuma.

Conforme é possível observar na figura 5, ocorre uma intensa elevação da atividade amilolítica no meio de cultura nas primeiras 36 horas, atingindo ao final desse período valores em torno de 120 U. Essas curvas são compatíveis com dados encontrados na literatura (Teodoro *et al.*, 2000), onde o ápice de produção

⁸ Dados semelhantes para todos os parâmetros foram encontrados no capítulo 4, desse modo uma discussão complementar pode ser encontrada no mesmo.

⁹ A diferença, nesse caso, quando comparado ao capítulo 4 está no fato de que foram realizados ensaios nos meios de cultura retirados do biorreator.

enzimática gira em torno de 24 e 36 horas de acordo com a variação das condições utilizadas, embora a composição do meio seja diferente. A elevação inicial da atividade amilolítica ocorre obviamente em função da presença de amido na composição do meio de cultura, pois a partir da hidrólise do amido há a disponibilização de glicose para o a cultura. Contudo, essa elevação não é completamente simultânea à fase de crescimento exponencial. O crescimento celular nas primeiras horas da fermentação é sustentado pelos açúcares de baixo peso molecular, como glicose, frutose e sacarose. Só a partir da redução dos seus conteúdos é que há, de fato, um uso efetivo da glicose proveniente da hidrólise do amido. Resultados similares em manipueira são apresentados por Nitschke (2004), Costa (2005) e Barros *et al.*, (2008).

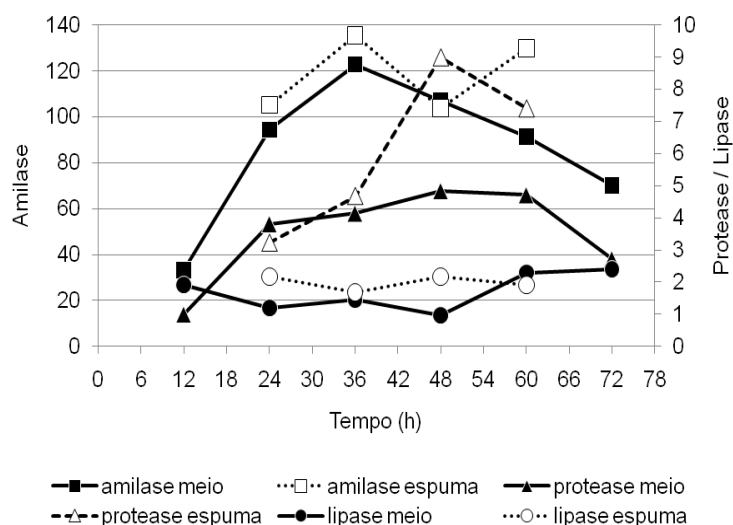


Figura 5. Cinética de atividade (U) amilolítica, lipolítica e proteolítica do meio de cultura centrifugado durante o processo de fermentação da manipueira por *Bacillus subtilis*.

Considerando a atividade encontrada na espuma, apesar de apresentar atividades superiores na maioria dos horários de amostragem (excetuando-se o último horário) não foram significativas as diferenças entre os valores encontrados no meio fermentado. Assim, não foi detectada uma recuperação para essas

categorias de enzimas, pois essa recuperação seria facilmente evidenciada por uma atividade superior na espuma, o que não foi o caso.

Assim como nos experimentos em manipueira em frascos¹⁰, a elevação nos níveis de atividade proteolítica é mais gradual, atingindo o máximo entre 48 e 60 horas. A baixa atividade mesmo no seu máximo pode estar relacionada ao fato de não haver indutor protéico. Além disso, a linhagem LB5a fora previamente selecionada como boa produtoras de biossurfactante (Nitschke *et al.*, 2004), o que faz com que, neste caso, a baixa atividade proteolítica seja provavelmente uma condicionante para essa elevada produtividade, pois a degradação do surfactante produzidos por *Bacillus subtilis* em tempos mais avançados de fermentação é um indício da atividade de protease presente no meio (Nitschke, 2004). Embora seus valores sejam crescentes desde as primeiras horas, a atividade proteolítica não parece estar diretamente atrelada ao crescimento microbiano, pois seus máximos valores só são atingidos aproximadamente 24 horas após o final da fase de crescimento exponencial.

As proteases parecem ser arrastadas diferencialmente pela espuma. Neste caso as atividades foram expressivamente superiores, especialmente no horário de pico, com valores que podem ser até duas vezes maiores na espuma que no meio de cultura. Embora significativo, esse fator de enriquecimento foi bem menor que para a surfactina, cujas concentrações na espuma podem atingir até 60 vezes a concentração no meio de cultura fermentado.

Em relação à lipase, assim como nos experimentos em frasco, a atividade foi baixa em todos os horários, tanto no meio de cultura como na espuma. Também não houve diferença significativa entre os valores de atividade encontrada em ambos.

4. Conclusão

Como esperado, os diferentes compostos monitorados apresentam perfis de cinética diferentes. Seus máximos são atingidos em diferentes estágios do processo, seja na fase de crescimento exponencial ou com o avançar da fase estacionária. De

¹⁰ Capítulo 4.

fato, essa diferença parece ser derivada das características das rotas de síntese bioquímica e da concentração de substratos, especialmente fontes de carbono, que no caso da manipueira é basicamente composta por carboidratos. Considerando esses aspectos, assim como dados de outros processos, a produção em elevados níveis de todos os bioprodutos é uma tarefa improvável. Contudo, justamente por se ter um conhecimento do comportamento de cada um desses compostos nas diversas fases do processo é possível o estabelecimento de estratégias que possibilitem o melhor aproveitamento e recuperação de cada um desses.

Em linhas gerais, a produção de biossurfactante parece estar atrelada ao crescimento exponencial. Essa característica mostra potencial para a produção desses compostos em um processo contínuo. Por sua vez, a produção de acetoína concentra-se no final desta fase, o que coincide com o início do esgotamento de açúcares, ou seja, o processo seria afetado pela introdução de novo substrato ao processo em andamento. Por outro lado, há potencial para produção de enzimas, majoritariamente amilases. Isso poderia acontecer em processo em batelada ou contínuo com uma borbulhamento da espuma colapsada integral ou diluída, pois não haveria arraste da enzima enquanto o biossurfactante seria arrastado do líquido. Assim, o processo fermentativo da manipueira pela linhagem (LB5a) de *Bacillus subtilis* apresenta potencialidade como fonte de alguns biocompostos de interesse industrial em um processo de coprodução.

5. Referências Bibliográficas

Barros FFC, Ponezi AN, Pastore GM (2008) Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. J Ind Microbiol Biotechnol 35:1071-1078. DOI: DOI 10.1007/s10295-008-0385-y

Bicas JL, Barros FFC, Wagner R, Godoy HT, Pastore GM (2008) Optimization of *R*-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene. J Ind Microbiol Biotechnol 35:1061-1070. DOI: 10.1007/s10295-008-0383-0

Bicas JL, Quadros CP, Neri-Numa IA and Pastore GM. (2010) Integrated process for co-production of alkaline lipase and *R*-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*. Food Chem 120:452-456. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.037

Buckland BC, Lilly MD (1993) Fermentation: an overview. In: Rehm HJ, Reed G, Püler A, Stadler P. (eds) *Biotechnology*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Federal Republic of Germany) and VCH Publishers Inc., New York, NY (USA), pp 7-22 (1993).

Coraucii-Neto D (2008) Processo tecnológico integrado para produção de lipídios e biodiesel por algas utilizando como substratos vinhaça e/ou CO₂, resíduos das destilarias de álcool (etanol). BR0705520-0 A2.

Costa GAN (2005) Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Davis DA, Lynch HC, Varley J (2001) The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. Enzyme Microb Technol 28: 346–354. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00327-6

Hyun HH, Zeikus JG (1985) Simultaneous and enhanced production of thermostable amylases and ethanol from starch by cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Appl Environ Microbiol 31: 1174-1181 DOI: 0099-2240/85/051174-08\$02.00/0

Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M (2007) Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. Bioresour Technol 98: 150–157. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.11.001

Lin J-P, Tian J, You J-F, Jin Z-H, Xu Z-N, Cen P-L (2004) An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. *Biochem Eng J* 21: 19–25. DOI:10.1016/j.bej.2004.04.013

Macedo GA, Pastore GM, Sato HA, Park YK (2001) *Bioquímica Experimental de Alimentos*, first ed. Editora Varela, São Paulo, Brasil.

Maddox IS, Qureshi N, Roberts-Thomson K (1995) Production of Acetone-Butanol-Ethanol from Concentrated Substrates Using *Clostridium acetobutylicum* in an Integrated Fermentation-Product Removal Process. *Process Biochem* 30: 209-215. DOI:10.1016/0032-9592(95)85001-5

Makkar RS, Cameotra SS (1997) Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J Ind Microb Biotech* 18: 37-42, 1997. DOI: 10.1038/sj.jim.2900349

Martins VG, Kalil SJ, Costa JAV (2008) Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quim Nova* 31: 1942-1947. Doi: 10.1590/S0100-40422008000800005

Nitschke M (2004) Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Tese de Doutorado; Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Nitschke M, Ferraz C, Pastore GM (2004) Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz J Microbiol.* 35: 81-85, 2004. DOI: 10.1590/S1517-83822004000100013

Perna RF (2010) Fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Prazeres JN (2006) Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Prazeres JN, Cruz JAB, Pastore GM (2006) Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. Braz J Microbiol 37: 505-509. DOI: 10.1590/S1517-83822006000400019

Schallmeyer M, Singh A, Ward, OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Can J. Microbiol 150: 1-17. DOI: 10.1139/W03-076

Sheppard JD, Mulligan CN (1987) The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. Appl Microbiol Biotechnol. 27: 110-116, 1987. DOI: 10.1007/BF00251931

Syu, M-J, Chen Y-H (1997) A study on the α -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. Chem. Eng. J. 65 (1997) 237-247. DOI: 10.1016/S1385-8947(97)00020-X

Teodoro CES, Martins MLL (2000) Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Braz J Microb 31: 298-302. DOI: 10.1590/S1517-83822000000400011

Considerações finais

A partir das discussões de cada uma das unidades desse trabalho algumas considerações podem ser feitas:

1. É possível a produção e recuperação simultânea de dois ou mais bioprodutos por *Bacillus subtilis* em uma mesma fermentação. A diversificação de possibilidades dentro dessa combinação de micro-organismo e substrato, que já é largamente documentada para a produção de biossurfactante, torna essa fermentação ainda mais interessante do ponto de vista econômico e ecológico;
2. O uso da coprodução aproxima esse processo dos conceitos de biorrefinarias, sistemas no qual há uma grande diversidade de matérias-primas de interesse originada a partir de uma (ou poucas) fonte(s) de biomassa, e do conceito de química verde, que prega que os conceitos de reduzir, reutilizar e reciclar devem ser considerados em toda a indústria química e bioquímica e que o uso de produtos de elevada toxidez devem ser eliminados desses setores da indústria.

No entanto, algumas questões ainda devem ser resolvidas antes da completa aplicação. Desse modo alguns trabalhos futuros devem ser realizados:

1. Apesar dos estudos sobre a variação na composição na manipueira e seu reflexo na produtividade de biossurfactante, não foi feito o mesmo para os demais componentes. O mesmo para soluções diluídas de manipueira;
2. Não se sabe o comportamento da fermentação e na cinética de produção bem como na produtividade de cada um dos compostos estudados caso houvesse uma alteração de parâmetros controláveis como agitação,

temperatura e aeração. Além disso, estudos adicionais sobre processo em batelada e contínuo são necessários;

3. Há uma necessidade do aprimoramento dos métodos de recuperação primária e de purificação dos produtos da fermentação, bem como o estudo do comportamento do processo caso haja o uso de micro-organismos geneticamente modificados para a superexpressão de um ou mais dos referidos biocompostos.