



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologias e Ciências
Instituto de Química

Ixthá Hasselmann Valeriano

**Fermentação alcoólica de hidrolisado de farelo de mandioca
usando levedura *Saccharomyces cerevisiae* álcool resistente**

Rio de Janeiro

2013

Ixthá Hasselmann Valeriano

**Fermentação alcoólica de hidrolisado de farelo de mandioca usando
levedura *Saccharomyces cerevisiae* álcool resistente**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadores: Prof^a. Dra. Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Prof. Dr. Edmar das Mercês Penha

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

V163 Valeriano, Ixthá Hasselmann.
Fermentação alcoólica de hidrolisado de farelo de mandioca usando levedura *Saccharomyces cerevisiae* álcool resistente. / Ixthá Hasselmann Valeriano. - 2013.
84 f.

Orientador: Márcia Monteiro Machado Gonçalves.
Orientador: Edmar das Mercês Penha.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Resíduos - Teses. 2. Mandioca – Teses. 3. Hidrólise - Teses. I. Gonçalves, Márcia Monteiro Machado. II. Penha, Edmar das Mercês. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 577.152.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Ixthá Hasselmann Valeriano

**Fermentação alcoólica de hidrolisado de farelo de mandioca usando
levedura *Saccharomyces cerevisiae* álcool resistente**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 10 de dezembro de 2013.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Márcia Monteiro Machado Gonçalves (Orientadora)
Instituto de Química – UERJ

Prof. Dr. Edmar das Mercês Penha (Orientador)
Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química - UERJ

Dra. Edna Maria Morais Oliveira
Embrapa Agroindústria de Alimentos

Prof^a. Dra. Sorele Batista Fiaux
Faculdade de Farmácia - UFF

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Consagro este trabalho ao Deus vivo. Pois a mim se revelou através da Bíblia. A Ele me converti, pois me salvou através do sangue do seu Filho, Jesus Cristo; limpando-me do meu pecado e garantindo, portanto, a minha vida eterna.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, ao grandioso Deus, que cuida de mim, inclusive, através das pessoas aqui citadas e por me fazer ver o sentido de amá-lo de todo o meu coração, e de toda a minha alma, e de todo o meu entendimento, e de todas as minhas forças, como Jesus disse ser o primeiro mandamento (Marcos 12:30).

À professora Márcia Monteiro Machado Gonçalves, que foi paciente comigo, incentivadora e sempre esteve disposta a me ajudar quando precisei.

Ao professor Edmar das Mercês Penha que, com seu jeito calmo de ser, foi dando dicas valiosíssimas para o trabalho e também sempre esteve pronto a me ajudar.

Aos companheiros dos laboratórios 305 e 321: Mariana, Flávia, Veiga, Diana, Munique, Yohandrina, Renata, Leonardo e muitos outros, em especial, aos meus alunos de IC, Thamara, Samara e Arthur. Agradeço a todos pela ajuda, preocupação com a minha saúde, conversas excelentes, amizade e carinho.

Aos amigos que fiz no PPGEQ-UERJ (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UERJ), dentre eles Antoniel, Deivisson, Denise, Patrícia, Renata, Aline e Cristiano, por compartilharmos momentos de alegria e angústia durante as disciplinas do curso.

Aos professores do PPGEQ-UERJ, e aqui ressalto os meus agradecimentos ao secretário Marco Antônio Coelho, que não esconde o seu carinho e preocupação para com os alunos, tornando o ambiente muito mais agradável para estudar e trabalhar. A CAPES, que concedeu a bolsa para meus estudos.

Ao professor Antônio Carlos Augusto da Costa, pelo empréstimo de um banho termostático e à Gisele dos Santos Miranda, pela doação de antiespumante, ambos essenciais para o andamento deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios da Embrapa – Agroindústria de Alimentos que realizaram as análises de caracterização dos farelos de mandioca (Laboratório de Físico-Química, Laboratório de Minerais) e os ensaios de cromatografia (Laboratório de Processos Fermentativos), dentre os quais cito Sidinéia Cordeiro de Freitas e Selma da Costa Terzi.

A toda minha família, destacando, minha mãe, Danuza, meu padrasto, Moss, meu irmão, Paulo Moss, minha avó, Hely, e meu primo Bruder e sua

mulher, Daniele, que me receberam em sua casa com toda a satisfação e prontidão.

Aos meus familiares peruanos, especialmente à família Ramos Valeriano (Mele, Julita, Nery, Daniel, Luz, Ruben, Vanessa, Shirley, Valeria, Joseph e Gabriel), pela maravilhosa estadia juntos no início de 2011, incentivo para ler a Bíblia e ensinamentos deste livro por telefone, todo o mês!

Aos meus amados irmãos da Igreja Batista em Icaraf, pelas orações, companhia e estudo da Palavra de Deus, que está na Bíblia.

Aos meus amigos Livia, Bárbara, Danielle, Cristine, Dianne, Alexandre e Luiz, que acrescentaram alegria nos meus dias de mestranda.

Àquelas pessoas que estiveram envolvidas no tratamento da minha tendinite nos dois braços, são elas: minhas fisioterapeutas tia Dadá, Maria José, Luciana, Karla e Alzira e minha psicóloga Marília. Elas me ajudaram a lidar melhor com os movimentos repetitivos do meu trabalho e o estresse cotidiano.

Por último, à banca examinadora, por colaborar no enriquecimento desta dissertação.

Visto como na sabedoria de Deus o mundo não conheceu a Deus pela sua sabedoria, aprouve a Deus salvar os crentes pela loucura da pregação.

1 Coríntios 1:21

RESUMO

VALERIANO, Ixthá Hasselmann. *Fermentação alcoólica de hidrolisado de farelo de mandioca usando levedura *Saccharomyces cerevisiae* álcool resistente*. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A matriz energética mundial é baseada em fontes fósseis e renováveis. No Brasil, o bioetanol é gerado principalmente a partir da cana-de-açúcar. Resíduos agroindustriais (fontes celulósicas ou amiláceas) despontam como biomassas alternativas à cana-de-açúcar, para aumentar a competitividade deste combustível renovável frente aos de origem fóssil e também favorecer a sustentabilidade e a segurança alimentar e energética, pois são ricos em polissacarídeos não diretamente fermentescíveis, abundantes (problema ambiental) e apresentam baixo valor comercial. O farelo de mandioca é um exemplo de resíduo sólido gerado na produção de fécula (amido) e farinha de mandioca que ainda contém, em média, 75% de amido. Consequentemente, deve ser previamente hidrolisado e posteriormente fermentado por leveduras do gênero *Saccharomyces* para gerar etanol. O objetivo deste estudo foi produzir bioetanol a partir de hidrolisados enzimáticos de farelo de mandioca, usando levedura álcool resistente (AR). Primeiramente, a concentração de açúcares obtida a partir da hidrólise enzimática foi verificada através de um planejamento fatorial completo (2^4), com triplicata no ponto central, a fim de investigar a influência dos seguintes fatores na hidrólise: concentração de α -amilase (Termamyl 2X), tempo de liquefação, concentração de glucoamilase (AMG 300L) e o tempo de sacarificação. A condição de hidrólise mais favorável foi a do ensaio com 0,517 mL de AMG/g amido, 0,270 mL de Termamyl/g amido, 1h de tempo de liquefação e 2h de tempo de sacarificação. O caldo resultante da condição escolhida alcançou altas concentrações de glicose (160 g/L). Os ensaios de fermentação alcoólica foram realizados em duplicata em biorreator de 3L, em regime de batelada, a 30°C, 100 rpm e pH 5,5. Cerca de 3 g/L (massa seca) de uma linhagem de levedura álcool tolerante, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen BY4741, crescida por 12h em meio YEDP (2% de glicose) foram usados como inóculo. O mosto consistiu de um litro de hidrolisado (160 g/L de glicose) fortificado com extrato de levedura (1%) e peptona de carne (1%), além da adição de um antiespumante (Tween 80) na concentração de 0,05% (m/v). Em 30 horas de fermentação, a média da concentração de etanol obtida foi de 65 g/L. A eficiência foi de 87,6% e o rendimento e a produtividade foram 0,448 e 2,16 g/L.h, respectivamente. Os resultados indicaram a aplicabilidade do farelo de mandioca como matéria-prima para a produção de bioetanol.

Palavras-chave: Resíduo amiláceo. Farelo de mandioca. Hidrólise enzimática. Etanol. Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

VALERIANO, Ixthá Hasselmann. *Alcoholic fermentation of hydrolyzated cassava bagasse using alcohol resistant Saccharomyces cerevisiae*. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The world energy matrix is based on fossil and renewable sources. In Brazil, bioethanol is generated mainly from sugarcane. Agro-industrial wastes (cellulosic or starchy sources) emerge as an alternative to sugarcane biomass, in order to increase this renewable fuel competitiveness against fossil ones, and also promote sustainability, food security and energy security, because they are rich in polysaccharides (not directly fermentable), abundant (environmental problem), and have low commercial value. The cassava bagasse is an example of a solid waste originated from starch and cassava flour industries, which still contains on average 75% of starch. Consequently, it should be hydrolyzed and then fermented by *Saccharomyces* yeasts in order to generate ethanol. This study aimed to produce bioethanol from enzymatic hydrolysate of cassava bagasse, using alcohol resistant (AR) yeast. At first, the concentration of sugars obtained from enzymatic hydrolysis was verified using a full factorial design (2^4) with triplicate at the center point to investigate the influence of α -amylase concentration (Termamyl 2X), liquefaction time, glucoamylase concentration (AMG 300L), and saccharification time. The best condition of hydrolysis was 0,270 mL of Termamyl/g starch, 1h of liquefaction, 0,517 mL of AMG/g starch, and 2h of saccharification. The resultant syrup of the chosen condition achieves high levels of glucose (160 g/L). Alcoholic fermentation assays were performed in duplicate in a 3L bioreactor under batch regime at 30°C, 100 rpm and pH 5.5. About 3 g/L (dry weight) of an alcohol tolerant yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen BY4741, grown for 12 h in YEDP medium (2% glucose), were used as inoculum. The fermentation broth consisted of one liter of hydrolysate (160 g/L of glucose) supplemented with yeast extract (1%) and meat peptone (1%), plus the addition of an antifoam (Tween 80) in a concentration of 0.05% (w/v). At 30 hours of fermentation, the average ethanol concentration obtained was 65 g/L. The efficiency was 87.6% and the yield and the productivity were, respectively, 0.448 and 2.16 g/L.h. The results indicated the applicability of cassava bagasse as raw material for bioethanol production.

Keywords: Waste starch. Cassava bagasse. Enzymatic hydrolysis. Ethanol. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma geral do processo produtivo de fecularias.....	25
Figura 2	Fluxograma geral de uma farinheira.....	28
Figura 3	Estrutura da amilose e da amilopectina.....	34
Figura 4	Viscoamilograma típico de uma amostra de amido de mandioca obtido no RVA (Rapid Visco Analyser).....	37
Figura 5	Classificação das enzimas amilolíticas.....	38
Figura 6	Processos de produção de etanol a partir de mandioca, (a) HFS, Hidrólise e Fermentação em Separado ou Convencional, (b) SFS, Sacarificação e Fermentação Simultânea e (c) LSFS, Liquefação, Sacarificação e Fermentação Simultânea.....	47
Figura 7	Esquema de hidrólise enzimática.....	51
Figura 8	Esquema do Preparo do Inóculo.....	56
Figura 9	Esquema da fermentação alcoólica e da destilação do mosto.....	56
Figura 10	Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 24 com triplicata no ponto central mostrando a contribuição dos fatores estudados na concentração de ART.....	67
Figura 11	Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do modelo linear com os termos principais (A, B e C).....	68
Figura 12	Superfícies de resposta (A, B e C) e respectivas curvas de nível (D, E e F) do planejamento fatorial 23 com triplicata no ponto central sobre hidrólise enzimática, tendo como resposta a concentração de ART.....	70
Figura 13	Otimização através da função desejabilidade para a resposta concentração de ART.....	72
Figura 14	Fermentação alcoólica em meio YEDP utilizando levedura comercial (E1 com símbolos preenchidos) e <i>S. cerevisiae</i> AR (E2 com símbolos abertos). Crescimento celular (●,○), consumo de substrato em termos de glicose (■,□) e produção de etanol (▲,Δ) em função do tempo de fermentação.....	73
Figura 15	Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 13% de ART, usando linhagem AR, propagada em meio não adaptado (YEDP 2% em glicose - E3 com símbolos preenchidos) e pré-adaptado (hidrolisado 2% em ART - E4 com símbolos abertos). Crescimento celular (●,○), consumo de substrato em termos de ART (■,□) e produção de etanol (▲,Δ) em função do tempo de fermentação.....	75
Figura 16	Curva de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> AR (Hansen BY4741), em meio YEDP (2% em glicose).....	76
Figura 17	Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 16% de glicose (E5 com símbolos preenchidos e E6 com símbolos abertos), usando linhagem AR propagada em meio não adaptado (YEDP 2% em glicose). Crescimento celular (●,○), consumo de substrato em termos de glicose (■,□) e produção de etanol (▲,Δ) em função do tempo de fermentação.....	77

Figura 18	Mosto centrifugado não esterilizado antes e depois de aquecimento dentro do microdestilador.....	81
Figura 19	Biorreator Biostat A Plus da Sartorius em operação	99
Figura 20	Microdestilador Tecnal TE-012 em operação.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formas de aproveitamento da mandioca.....	17
Tabela 2	Distribuição das unidades produtoras de fécula no Brasil, por estado em 2001.....	22
Tabela 3	Brasil e Tailândia: produção de mandioca e indústria de fécula.....	24
Tabela 4	Destino e forma de fornecimento dos resíduos de fecularias brasileiras, por unidade industrial.....	31
Tabela 5	Composição de farelos de mandioca em % matéria seca.....	32
Tabela 6	Grau de hidrólise (G.H.) durante 32h de amido de tapioca (mandioca) tratado e não tratado com tampão de acetato de sódio, pH 3,5 e aquecimento a 60°C.....	40
Tabela 7	Quantidade de enzima comercial necessária para a hidrólise enzimática de fontes amiláceas.....	41
Tabela 8	Valores reais e codificados de planejamento fatorial aplicado à hidrólise.....	52
Tabela 9	Valores médios da caracterização dos farelos de mandioca....	64
Tabela 10	Matriz do planejamento estatístico para a hidrólise enzimática do FM, tendo como resposta a concentração de açúcares redutores totais (ART).....	66
Tabela 11	Análise da variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2 ³ com triplicata no ponto central para a concentração de ART, em valores codificados.....	69
Tabela 12	Parâmetros fermentativos dos Ensaios 5 e 6.....	79
Tabela 13	Comparação com trabalhos da literatura.....	80
Tabela 14	Comparação entre os processos de obtenção de bioetanol de fontes amiláceas no mundo e o material usado neste estudo..	82
Tabela 15	Fermentação alcoólica em meio YEDP utilizando levedura comercial (E1) e <i>S. cerevisiae</i> AR (E2).....	100
Tabela 16	Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 13% de ART, usando linhagem AR, propagada em meio não adaptado - YEDP 2% em glicose (E3) e pré-adaptado - hidrolisado 2% em ART (E4).....	100
Tabela 17	Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 16% de glicose (E5 e E6), usando linhagem AR propagada em meio não adaptado (YEDP 2% em glicose).....	101

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	A mandioca e o amido de mandioca: cenário nacional e internacional	22
2.2	Processamento da mandioca	24
2.2.1	<u>Fécula de mandioca</u>	24
2.2.2	<u>Farinha de mandioca</u>	27
2.2.3	<u>Resíduos</u>	30
2.2.3.1	<i>Farelo de mandioca</i>	32
2.3	Amido	33
2.3.1	<u>Composição química</u>	34
2.3.2	<u>Gelatinização e retrogradação</u>	35
2.4	Hidrólise enzimática de substrato amiláceo	37
2.5	Fermentação alcoólica	42
2.5.1	<u>Usinas de álcool amiláceo</u>	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	Caracterização físico-química do farelo de mandioca	50
3.2	Hidrólise enzimática do farelo de mandioca	51
3.2.1	<u>Planejamento experimental na hidrólise enzimática</u>	52
3.3	Fermentação alcoólica	54
3.3.1	<u>Micro-organismos</u>	54
3.3.2	<u>Preparo do inóculo</u>	55
3.3.3	<u>Ensaio de fermentação alcoólica</u>	56
3.3.3.1	<i>Ensaio 1 e 2: Comparação de linhagens em meio YEDP</i>	57
3.3.3.2	<i>Ensaio 3 e 4: Linhagem selecionada em meio hidrolisado</i>	57
3.3.3.3	<i>Ensaio 5 e 6: Inóculo não adaptado ao hidrolisado de FM</i>	58
3.4	Determinações analíticas	58
3.4.1	<u>Dosagem de açúcares redutores totais (ART) pelo método do DNS</u>	58
3.4.2	<u>Dosagem de células utilizando método turbidimétrico por espectrofotometria</u>	59
3.4.3	<u>Determinação de etanol no mosto pelo método NBR 13920</u>	60
3.4.4	<u>Quantificações de glicose e etanol por cromatografia líquida (HPLC)</u>	61
3.5	Cálculos de fermentação	61
3.5.1	<u>Rendimento</u>	61
3.5.2	<u>Eficiência de fermentação</u>	62
3.5.3	<u>Produtividade volumétrica</u>	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Matéria-prima	64
4.2	Hidrólise enzimática do farelo de mandioca	64
4.2.1	<u>Planejamento Experimental na Hidrólise Enzimática</u>	65
4.3	Fermentação alcoólica	73
4.3.1	<u>Ensaio 1 e 2: Comparação de linhagens em meio YEDP</u>	73
4.3.2	<u>Ensaio 3 e 4: Inóculo crescido em meio YEDP versus crescido em meio hidrolisado</u>	73

4.3.3	<u>Ensaio 5 e 6: Meio composto por hidrolisado de FM contendo altas concentrações de glicose</u>	76
5	CONCLUSÕES	83
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO 1 - Matéria-prima, biorreator e microdestilador.....	99
	ANEXO 2 – Dados de fermentação: concentrações de açúcares, células e etanol para os Ensaio de 1 a 6.....	100
	ANEXO 3 – Trabalhos publicados em 2013.....	102

INTRODUÇÃO

A atual dependência mundial por energia faz aumentar a exigência pelas de origem renovável. Os combustíveis obtidos por biotransformação, como o bioetanol, competem por mercado com os de origem fóssil (gasolina, gás natural, etc.). No Brasil, grande parte do álcool combustível provém da fermentação da cana-de-açúcar, contudo outras matérias-primas podem ser usadas para este fim, inclusive os rejeitos agroindustriais, não apenas as de base celulósica, mas também aquelas que contêm grande quantidade de amido (resíduos amiláceos). A utilização dos mesmos na geração de etanol pode, além de evitar a competição com alimentos, estabilizar o preço deste biocombustível frente à gasolina e diminuir os possíveis impactos ambientais que estes possam vir a provocar. Um exemplo de resíduo agroindustrial é o farelo de mandioca, que possui grande quantidade de amido.

A mandioca é originária da América do Sul (UCLA, 2011) e acredita-se que tenha sido enviada para outros continentes a partir da conquista da América pelos europeus (DEMIATE & KOTOVICZ, 2011). Ela apresenta boa tolerância à seca e a solos pouco férteis (SEBRAE BAHIA, 2009; CAMILI, 2007), possuindo a maior produção de amido por hectare do mundo (UCLA, 2011). Por isso, essa cultura é tão propagada em países mais pobres (GROXKO, 2012). Prova disso é que, em 2011, o continente africano apareceu como o maior produtor mundial (55,9% de 252,2 milhões de toneladas). Dentre os países, o Brasil ocupa a segunda colocação, com 10,1%, atrás da Nigéria, com 20,8% (EMBRAPA: MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2013; GROXKO, 2011). No Brasil, existem mais de 80 espécies de mandioca e 4 mil variedades, sendo cultivada em todos os estados (CHICHERCHIO, 2012; CAMILI & CABELLO, 2007). A mandioca pode ser classificada de acordo com a concentração de cianeto, uma substância nociva à saúde humana, em amarga ou brava (tóxica) e doce ou mansa (atóxica). A primeira categoria é usada industrialmente (mandioca de indústria) e a segunda na culinária (mandioca de mesa). A raiz da mandioca, por apresentar grande quantidade de água (50-70%) é um material bastante perecível (RESENDE & OLIVEIRA, 2009). Esse

fato faz com que as raízes sejam industrialmente processadas em, no máximo, 2 a 3 dias após a colheita, sendo necessário um planejamento do fluxo contínuo entre colheita e industrialização, de modo a minimizar o tempo de estocagem (CAMILI, 2007).

Na Tabela 1 aparecem praticamente todas as possíveis formas de se aproveitar a mandioca.

Tabela 1 – Formas de aproveitamento da mandioca.

MANDIOCA	Parte aérea	Folhas	Alimentação animal (triturada) e humana (suplemento)			
		Hastes	Material de plantio, alimentação animal (silagens, fenos e <i>in natura</i>)			
	Raiz	Alimentação humana	Cozida, frita, sob a forma de farinha, bolos, biscoitos, pães, tortas, sopas, mingaus, beijus, tapioca/sagu, purês, suflês, empadas, cuscus, roscas, cremes, pudins, nhoques, etc.			
			Alimentação animal	Cruas Cozidas Desidratadas (farinhas, raspas e pellets)		
		Indústria		Amido (Fécula ¹)	Uso alimentício (amido nativo e amido modificado)	Glucose Maltose Fermentos Gelatinas Féculas (amido nativo) Dextrina Sorbitol (adoçante) Vitamina C
			Uso industrial (nativo e modificado)		Adesivos, têxtil, papel e celulose, farmacêutica, explosivos, calçados, tintas, embutidos (carnes), cervejeira, petrolífera, álcool*	
		Indústria	Amido fermentado	Uso humano/Alimentício	Polvilho azedo, confeitarias, padarias, ind. de biscoitos, pães	
			Farinhas	Consumo humano	Farinhas de mesa Farinha panificável	
		Indústria		Farinhas	Consumo animal	Rações balanceadas
			Indústria		Raspas	Farinhas de raspas
		Indústria		Raspas		Consumo animal
			Indústria		*Álcool	Combustível Desinfetante Bebida Perfumaria Indústria farmacêutica
		Indústria		Resíduo sólido (Farelo de mandioca)		Descarte em aterro Alimentação animal Álcool*

FONTES: CÂMARA SETORIAL DA CADEIA PRODUTIVA DA MANDIOCA E DERIVADOS, 2012; SPIER, 2005; ALVES *et al.*, 2003

Conforme a Tabela 1, a parte aérea da mandioca é praticamente destinada à alimentação animal e humana (CAMILI, 2007). A raiz, além destas finalidades, também é útil na produção de farinha e fécula, transformando-se num alimento de alto valor energético, com elevadas concentrações de amido, fibras e alguns minerais (SEBRAE BAHIA, 2009). A farinha, produzida pelas

¹ Também denominado amido, polvilho doce ou goma (ALEXANDRINO, 2006). Fécula e amido podem ser tratados como sinônimos, uma vez que são quimicamente iguais. No entanto, a legislação brasileira é uma das poucas no mundo a distinguir estes dois termos. De acordo com ela, a fécula é considerada a fração amilácea obtida das raízes, tubérculos e rizomas, enquanto o amido é a fração extraída da parte aérea da mandioca (SPIER, 2005).

casas de farinha ou farinheiras, remete à uma especificidade regional, principalmente no Nordeste. A fécula e seus produtos derivados podem servir tanto para o consumo humano, quanto como insumo para indústrias de cola, de mineração, de tecidos, de açúcar e álcool, de acetona e de plásticos biodegradáveis (CHICHERCHIO, 2012; UCLA, 2011; CAMILI, 2007).

O etanol obtido pela fermentação do amido extraído da mandioca pode ter as seguintes aplicações: combustível, desinfetante, bebida ou insumo para a produção de álcool fino², usado em indústrias de perfume ou farmacêutico (CAMILI, 2010; ALVES *et al.*, 2003).

As indústrias processadoras de mandioca tendem a se estabelecer nas proximidades de fontes desta matéria-prima. Elas podem ser classificadas segundo o seu porte, ou seja, sua capacidade de processamento, como artesanais, pequenas (~100t de raízes/dia), médias (~200t de raízes/dia) e de grande porte (mais de 400t de raízes/dia) (APLEVICZ, 2006).

No Brasil a época de plantio da mandioca vai de abril a outubro e a colheita pode ser feita ao longo do ano (CHICHERCHIO, 2012). Entretanto, nos meses de abril a agosto (estação de seca), observa-se um aumento do rendimento industrial e, conseqüentemente, de resíduos produzidos. Mesmo em pequenas unidades fabris, tais como casas de farinha, geram-se grandes quantidades de resíduos (CAMILI, 2007).

Normalmente, para cada tonelada de mandioca processada tem-se, em média, 150 kg de farelo de mandioca (base seca) e 6 kg de casca. Estes rejeitos sólidos são muitas vezes descartados em aterros sem nenhum tipo de tratamento, o que traz preocupações quanto à sua disposição no meio ambiente (PANDEY *et al.*, 2000).

Essa situação leva as autoridades e a comunidade científica a buscar medidas efetivas para a mitigação deste problema. Uma delas tem-se demonstrado promissora, o aproveitamento destes resíduos em outras atividades. Essa medida, além de diminuir a poluição, permite sua valorização econômica, pois transforma os rejeitos em coprodutos e, conseqüentemente, agrega valor ao processo de agro-industrialização (CAMILI & CABELLO, 2007).

² Veículo inerte, livre de aldeídos, que não interfere na composição do produto final, um fármaco, por exemplo (BRINGHENTI & CABELLO, 2005).

Outra questão importante que esta medida poderia suavizar é a questão da segurança alimentar, evitando a disputa por terras agriculturáveis entre matérias-primas, para a produção de biocombustíveis (por exemplo, cana-de-açúcar e milho) e para a produção de alimentos (VALLE, FELTRAN & CARVALHO, 2008).

Sendo assim, em tempos de desenvolvimento sustentável, busca-se aproveitar os resíduos da agroindústria brasileira, considerados um problema ambiental, para produzir etanol, pois estes são ricos em polissacarídeos não diretamente fermentescíveis, abundantes e com baixo valor comercial (BRINGHENTI, CABELLO & URBANO, 2007).

Além do mais, esses rejeitos agroindustriais podem substituir em parte a cana-de-açúcar e conseqüentemente, muitos produtores de mandioca podem se beneficiar tanto pelo cultivo de subsistência quanto pela comercialização de possíveis subprodutos para a indústria de álcool. Nesse sentido, o desenvolvimento do álcool carburante deve ser condizente com o investimento efetuado (GONÇALVES *et al.*, 2007), tanto para a instalação da planta como para a viabilidade de escoamento da produção.

Uma das possibilidades se dá justamente na utilização do farelo de mandioca, resíduo sólido gerado na produção de fécula (amido) e farinha de mandioca, que contém em média 75% de amido e 11,5 % de fibras. Agrega-se, portanto, mais valor a esta matéria-prima amilácea, que já é destinada às indústrias de ração, ao utilizá-la na produção de bioetanol (LEONEL & CEREDA 2000a).

De um modo geral, a transformação desse amido residual em etanol deve passar pelas seguintes etapas: (1) hidrólise enzimática, para a conversão do amido em açúcares simples e (2) fermentação alcoólica, que transforma o açúcar hidrolisado em etanol.

A etapa de hidrólise mostra-se determinante para obtenção dos açúcares fermentescíveis visando à produção do bioetanol em elevadas concentrações. Geralmente, este processo é realizado em duas etapas: liquefação empregando α -amilases e sacarificação utilizando glucoamilases sob agitação (SUMAN *et al.*, 2011). Em seguida, os açúcares obtidos podem ser metabolizados a álcool por leveduras do gênero *Saccharomyces* (LEONEL & CEREDA, 2000a).

A fermentação de substratos amiláceos, como o milho, requer de 48 a 72h e pode alcançar concentrações finais de 10-12% (v/v) de etanol (BAI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008; BOTHAST & SCHLICHER, 2005). De forma geral, as leveduras industriais possuem resistência a múltiplos estresses, tais como tolerância ao etanol produzido (BASSO, BASSO & ROCHA, 2011; BELLUCO, 2001), suportando, por exemplo, 12% (v/v) de etanol (BAI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008).

1. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal estabelecer as condições ideais para fermentação alcoólica de hidrolisados de farelo de mandioca empregando levedura álcool resistente.

Os seguintes objetivos específicos podem se destacados:

- 1) Estabelecer as condições adequadas para obtenção de hidrolisados de farelo de mandioca empregando a rota enzimática;
- 2) Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado empregando linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* álcool resistente;
- 3) Determinar as melhores condições para a fermentação do hidrolisado de farelo de mandioca, em reator de bancada de 2L de volume útil, visando definir uma condição que propicie maiores rendimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A mandioca e o amido de mandioca: cenário nacional e internacional

A cadeia produtiva da mandioca tem relevância tanto no setor industrial quanto na base alimentar da maioria da população de baixa renda, gerando divisas no campo e na agroindústria (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Os principais estados produtores brasileiros de mandioca são Pará (17,7%), Paraná³ (15,8%), Bahia (12,9%), Maranhão (6,7%) e São Paulo (6,0%), que juntos, respondem por 59,1% da produção nacional, de 26,1 milhões de toneladas (GROXKO, 2012).

A industrialização da mandioca, no entanto, é pouco difundida na maioria dos estados brasileiros, que importam a fécula e a farinha, principais derivados industriais da mandioca, de outras regiões. As fecularias brasileiras, implantadas desde a década de 1970, ganharam notoriedade na década de 1990, chegando a 73 fecularias (Tabela 2), que, atualmente, representam 100% do total no país (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, 2013; ALVES *et al.*, 2003).

Tabela 2 – Distribuição das unidades produtoras de fécula no Brasil, por estado em 2001.

Estado	Número de plantas	%	Capacidade de processamento (toneladas de raiz/dia)	%	Capacidade média por unidade (tonelada de raiz/unidade)
PR	42	58	12.330	68	294
MS	13	18	3.100	17	238
SC	11	15	1.320	07	120
SP	07	10	1.430	08	204
Brasil	73	100	18.180	100	249

Fonte: ALVES *et al.*, 2003

³ O preço pago ao produtor do Paraná no mês de dezembro de 2012 foi de R\$ 134,1/t de raiz de mandioca (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012).

Portanto, a produção de fécula⁴ nacional, de aproximadamente 519,9 mil toneladas, se deve praticamente à região Centro-Sul. Deste total, o Paraná representa 72%, o Mato Grosso do Sul, 17% e São Paulo, 9,2% (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, 2013).

A fécula de amido é utilizada principalmente na indústria alimentícia (58%), sendo apenas 10% na indústria química. Quanto ao mercado externo, a competição torna-se desvantajosa, devido à alta instabilidade dos preços, a desorganização interna e o fato da grande maioria das fecularias brasileiras operar em pequena escala, em relação ao padrão internacional. A escala média, em território brasileiro, é de 250 t de mandioca por dia, enquanto, na Tailândia, é de aproximadamente 800 t de raiz por dia, que equivale a 200 t de fécula por dia (ALVES *et al.*, 2003; SRIROTH *et al.*, 2000).

A participação brasileira na produção mundial de mandioca caiu de 30%, em 1970, para 10,1% (GROXKO, 2012). A Tailândia, por sua vez, teve a sua exportação aumentada de 1,4 milhão, no triênio 1973-1975, para 7 milhões de toneladas de mandioca, em 2001 (ALVES *et al.*, 2003).

A Tailândia é o maior produtor e exportador mundial de fécula, empregando a mandioca apenas na industrialização. Seus maiores importadores são China, Japão e América do Sul, portanto, a fécula tailandesa compete com a fécula de mandioca brasileira. Além do mais, a Tailândia busca alternativas para atender a crescente demanda por energia, do mesmo modo que outros países asiáticos, e encontra, na mandioca, uma possível fonte para produzir etanol. Inclusive, o governo tailandês permitiu a mistura de 10% de etanol (proveniente de cana-de-açúcar e de mandioca) à gasolina (FELIPE, ALVES & VIEIRA, 2013).

Na Tabela 3, a produção de mandioca e de fécula do Brasil e da Tailândia é comparada.

⁴ Em 2012, a fécula obteve um preço médio de R\$ 1.344,98/t (a prazo) (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, 2013).

Tabela 3 – Brasil e Tailândia: produção de mandioca e indústria de fécula

Item	Unidade	Brasil	Tailândia
Produção de mandioca	Milhões de t	24,5	22,0
Área cultivada	Milhões de ha	1,8	1,1
Produtividade agrícola	t/ha	12,4	18,8
Número de fecularias	Unidades	69	80
Produção de fécula	Mil t	516	2.500
Exportação de fécula	Mil t	528	1.500

Fonte: FELIPE, ALVES & VIEIRA, 2013

2.2. Processamento da mandioca

Uma breve descrição dos dois possíveis processamentos da raiz de mandioca pode ser vista na sequência, que gera fécula ou farinha. Ao final, a questão dos resíduos obtidos neste processo é retomada sendo destacada, em subitem a parte, o farelo de mandioca, potencial fonte de amido para diversos processos.

2.2.1. Fécula de mandioca

A produção de fécula de mandioca consiste nas seguintes etapas: lavagem e descascamento das raízes, ralação (para desintegrar as células e liberar os grânulos de amido), separação das fibras e do material solúvel, terminando com a secagem (LEONEL & CEREDA, 2000a), conforme disposto na Figura 1.

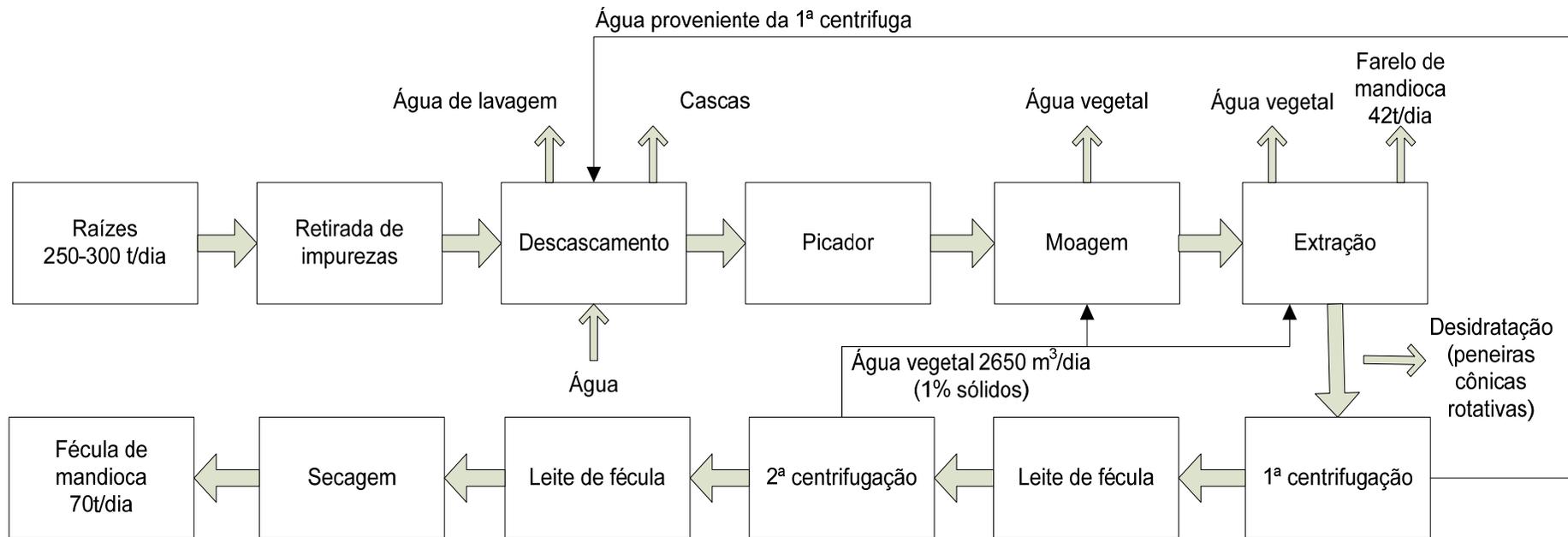


Figura 1 – Fluxograma geral do processo produtivo de fecularias.

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2007; SPIER, 2005.

Inicialmente, as raízes são divididas em depósitos por lotes para controlar a chegada delas. Após a retirada das impurezas, as raízes seguem para a etapa de descascamento, onde camada externa da raiz é retirada. A lavagem e o descascamento podem ser feitos de forma separada, diferentemente do que aparece na Figura 1. Em seguida, os picadores promovem o corte das raízes, a fim de facilitar a moagem (trituração ou ralação). Na etapa de extração, ocorre a desintegração dos pedaços em peneiras centrífugas (extratores) cada vez mais finas, que favorecem o rompimento máximo das células. Desta fase, originam-se como resíduos o farelo e o leite de fécula (ou leite de amido). Por fim, a purificação da massa amilácea (produto de interesse) é realizada em centrífugas. Conforme o fluxograma, a água suja da primeira centrífuga pode ser reaproveitada na etapa de descascamento. Na segunda centrífuga, remove-se 40-45% de umidade do produto refinado. No processo de secagem, a fécula desumidificada vai para um secador pneumático (*Flash Dryer*), onde é desidratada rapidamente. A fécula é, então, peneirada para atender uma classificação específica e embalada em sacos de 25 Kg (OLIVEIRA, 2007; LEONEL & CEREDA, 2000b).

O teor de amido extraído do processamento (ou o rendimento industrial) é um fator determinante para a competitividade mercadológica e está diretamente relacionado à tecnologia aplicada e, também, à variedade de raiz de mandioca processada. O rendimento das fecularias, no Brasil, alcança 25%, em média, ou seja, 250 kg de fécula são obtidos do processamento de uma tonelada de raiz e cerca de 130 kg de farelo de mandioca seco (75% de amido). Entretanto, estes valores oscilam bastante (14-32%) em função da heterogeneidade tecnológica, que caracteriza este ramo da indústria (ALVES *et al.*, 2003; LEONEL, CEREDA & ROAU, 1999).

Algumas fecularias de grande porte tratam seus resíduos visando à certificação ISO 14000 e transformam o resíduo sólido em matéria-prima destinada à rações. Como este processo tecnológico requer o uso intensivo de água, existem empresas reutilizando parte desta água na etapa de pré-lavagem das raízes. Reduz-se, desta forma, o impacto ambiental e, ao mesmo tempo, provoca-se a queda nos custos de produção. Numa seção a parte sobre resíduos, os tipos e formas de descarte ou aproveitamento são mostradas mais detalhadamente. Em relação à sazonalidade na produção da raiz de mandioca, mesmo durante a safra, as empresas raramente atingem uma ocupação completa do potencial instalado. Aliás, a tentativa de minimizar esta ociosidade se reflete na relação entre fecularias e fornecedores (agricultores), cuja forma de aquisição da matéria-prima mais comum (61%) é feita “via mercado”, sem haver comprometimento de qualquer parte e sem intermediação de um terceiro (ALVES *et al.*, 2003).

2.2.2. Farinha de mandioca

O Brasil possui duas estruturas importantes de produção de farinha de mandioca, as farinheiras e as casas de farinha. As primeiras, concentradas nas regiões Sul e Sudeste, são agroindústrias com estrutura de trabalho profissional e marca própria. As casas de farinha, por sua vez, concentram-se no Norte e Nordeste do país e apresentam métodos artesanais de produção, sem marca própria e menos profissionalizada, com alto índice de informalidade, baseando-se, na maioria das vezes, em trabalho familiar (GRANCO, ALVES & FELIPE, 2005).

O processo inicial da fabricação de fécula é igual ao da farinha de mandioca (SEBRAE BAHIA, 2009). Na Figura 2 aparece o fluxograma da produção de farinha.

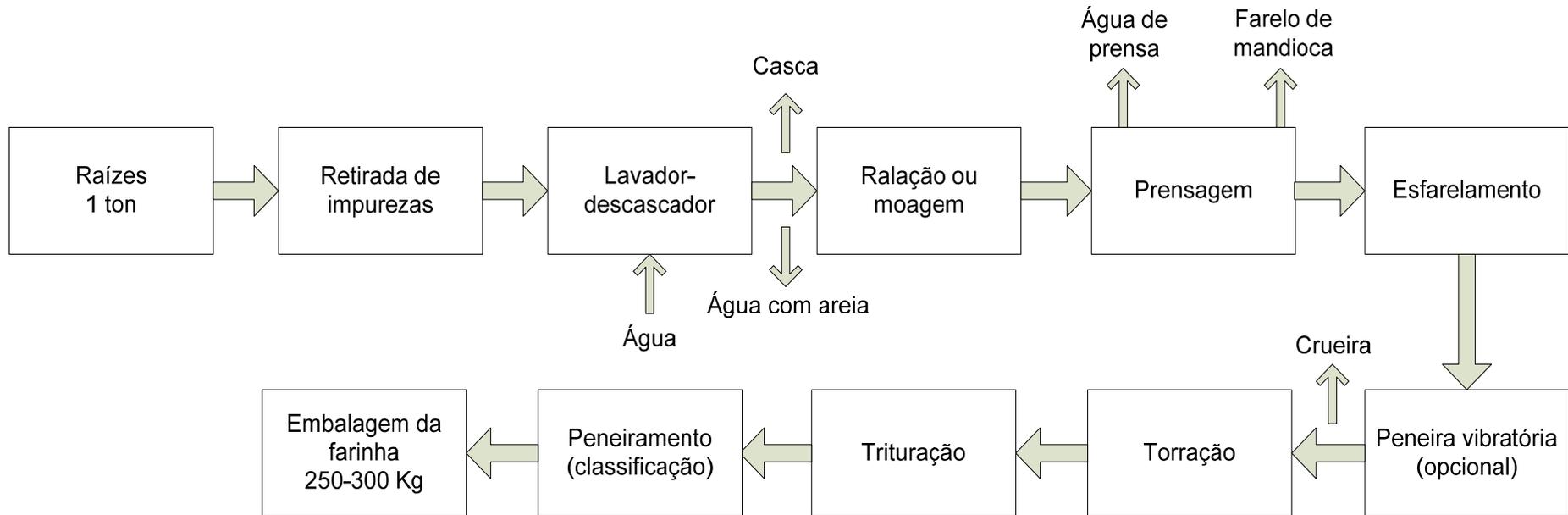


Figura 2 – Fluxograma geral de uma farinheira.

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2007.

Após a retirada de impurezas, as raízes são lavadas e descascadas, sendo que para a fabricação de farinha, o descascamento precisa ser melhor que na produção de fécula, podendo ser feito manualmente. A ralação é efetuada na cevadeira (ralador). Nesta etapa, ao contrário do processamento da fécula, não há adição de água. A massa resultante da ralação vai para a prensa (hidráulica, mecânica ou manual), a fim de reduzir a umidade da massa. Da prensa escoa um rejeito líquido⁵ por canaletas, onde se observa a decantação de amido e sólidos⁶. Desta forma, a prensagem permite que seja extraída da água de constituição a maioria dos princípios tóxicos da mandioca (glicosídeos cianogênicos) (CAMILI, 2007; OLIVEIRA, 2007). Os blocos compactados retirados da prensagem passam por um processo de esfarelamento e, opcionalmente, de peneiramento. Quando peneirada, a crueira (restos de cascas e fibras) é, em grande parte, aproveitada na composição da ração animal. Posteriormente, a sua secagem (torração) pode ser feita em diversos tipos de forno à lenha com o auxílio de pás giratórias, para evitar a queima da farinha. Por fim, a farinha é embalada em sacos de polietileno e acondicionada em lugares secos e escuros (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2008).

Camili (2007) relata rendimentos médios de 25 a 30 % no processamento industrial de raízes de mandioca para a produção de farinha, cuja oscilação é atribuída à variedade do tubérculo e à eficiência dos equipamentos utilizados. Sendo assim, uma tonelada de raiz produz cerca de 300 Kg de farinha. Esta autora ressalta ainda os problemas da farinha atualmente produzida: falta de uniformidade e ampla variação de sua composição. As possíveis influências são o fator cultivar e a idade da planta.

⁵ Água de prensa, água vegetal, manipueira, suco ou água de constituição.

⁶ Este resíduo sólido é constituído praticamente de amido com outros compostos químicos da mandioca, apresentando potencialidades de utilização (BRINGHENTI & CABELLO, 2005).

2.2.3. Resíduos

Os resíduos gerados pela industrialização da mandioca são a casca, o farelo (ou bagaço), que contém a fibra contida na polpa e o amido que não foi processado, e o líquido, água extraída da raiz contendo substâncias impregnadas. Os dois primeiros podem ser destinados à alimentação animal ou à fertilização do solo. O líquido, que apresenta odor desagradável, deve passar por tratamento químico, físico ou biológico antes de ser utilizado ou incorporado ao solo.

Conforme aparece em Moresco (2009), os resíduos líquidos são conhecidos como: (a) água de lavagem, sendo originária de lavadores/descascadores (Figura 1); (b) água de extração da fécula, que consiste na água de constituição da raiz (manipueira ou água vegetal) diluída com água de extração e (c) manipueira, um líquido resultante do processo de extração e purificação da fécula (Figura 1) e da prensagem da massa ralada para a produção de farinha (Figura 2). As possíveis formas de tratamento dos efluentes líquidos das fecularias e farinheiras são relatadas em Oliveira (2007) e Sebrae (2006), respectivamente.

Na Tabela 4, são apresentadas informações de uma pesquisa sobre a destinação (onde é usado ou destinado) e a forma de fornecimento (comercializado ou doado aos interessados) desses resíduos por unidade de fecularias brasileiras.

Tabela 4 – Destino e forma de fornecimento dos resíduos de fecularias brasileiras, por unidade industrial

Destino dos resíduos	Subprodutos					
	Casca		Farelo		Líquido	
	Unidade	%	Unidade	%	Unidade	%
Destino						
Lavoura	7	10	4	6	4	6
Alimentação animal	51	75	55	81	0	0
Processamento para ração	3	4	7	10	0	0
Lagoas de tratamento de efluentes	2	3	0	0	63	93
Descarte	5	7	2	3	1	1
Total de fecularias respondentes	68	100	68	100	68	100
Forma de fornecimento						
Doação	41	66	31	47	2	13
Venda	16	26	32	48	0	0
Uso próprio	5	8	3	5	14	88
Total de fecularias respondentes	62	100	66	100	16	100

Fonte: ALVES *et al.*, 2003

Em relação ao fornecimento dos resíduos, a doação é predominante para a casca (66%), enquanto para o farelo, há um equilíbrio entre a doação e a venda. A comercialização está sujeita à localização das fecularias. A proximidade com atividades pecuária facilita essa transação, enquanto a distância diminui a demanda pelos subprodutos, podendo causar transtorno para a empresa com despesas adicionais. (MORESCO, 2009; ALVES *et al.*, 2003; LEONEL & CEREDA, 2000a). Diante do exposto, percebe-se que a comercialização dos resíduos pode ser incrementada com a utilização dos mesmos na elaboração de produtos com maiores atrativos mercadológicos, como o etanol.

Na Tailândia, cerca de 340.000 toneladas de farelo de mandioca são produzidos por ano, tendendo a aumentar de quantidade (GAEWCHINGDUANG & PENGTHEMKEERATI, 2010).

Segundo Alves *et al.* (2003), ao remunerar os resíduos como subprodutos, o valor final da fécula tende a abaixar em relação ao produto concorrente direto, como o milho. Logo, a questão dos rejeitos agroindustriais

tem que ser tratada como prioritária, como já é feito na Europa, onde os subprodutos do processamento de milho e trigo são altamente valorizados.

2.2.3.1. Farelo de mandioca

Conforme exposto, das etapas de processamento da mandioca, independentemente do grau de tecnologia empregada, obtém-se um resíduo fibroso, denominado bagaço, massa ou farelo (LEONEL, JACKEY & CEREDA, 1998). Ele contém aproximadamente 40-70% de amido, que não pode ser fisicamente extraído (NIGAM & PANDEY, 2009). Inclusive, um estudo de caso feito por Leonel, Jackey & Cereda (1998,) mostra que aproximadamente um terço do amido encontrado na raiz fica retido no bagaço eliminado.

Na Tabela 5 podem ser vistos quatro exemplos distintos da composição do farelo quanto ao teor de amido e outros componentes.

Tabela 5 – Composição de farelos de mandioca em % matéria seca

	Farelo A ¹ Fecularia Júpiter Alimentos S/A	Farelo B ² Fecularia Halotek S/A	Farelo C ³ Fecularia Halotek S/A	Farelo D ⁴ Origem não informada
Amido	80,0	76,59	60,4	40,50
Açúcares	0,45	2,73	4,94	-
Fibras	11,5	13,93	15,41	50,55
Cinzas	1,14	0,97	2,10	1,10
Proteína	0,85	0,34	1,59	1,57
pH	5,8	5,16	5,5	-

¹Leonel & Cereda, (1999)

²Leonel & Cereda, (2000a)

³Saito & Cabello, (2006)

⁴Soccol (1994) *apud* Pandey *et al.* (2000)

Percebe-se uma grande variação desta composição, que pode estar diretamente relacionada à eficiência do processo de extração do amido (LEONEL & CEREDA, 2000b). Uma vez que este processamento é feito sob condições tecnológicas de baixo controle, quanto maior a eficiência de extração, menor a concentração de amido no farelo. Os valores de pH e acidez variam, por causa das fermentações naturais que o resíduo úmido pode sofrer (PANDEY *et al.*, 2000).

Para aproveitar a elevada concentração de amido no farelo de mandioca, o hidrolisado deste resíduo vem sendo pesquisado no cultivo de micro-organismos para bioprocessos e também para a produção de produtos de maior valor agregado (PANDEY *et al.*, 2000).

Segundo Nigam & Pandey (2009), este resíduo pode produzir ácido cítrico, sendo estudado em processos de fermentação em estado sólido, usando *Aspergillus niger* NRRL 2001. Mais detalhes deste processo são discutidos por estes autores.

Outro importante ácido orgânico que pode ser produzido a partir do hidrolisado do farelo de mandioca é o ácido fumárico (C₄H₄O₄), importante intermediário químico para sínteses que envolvem reações de esterificação. Uma breve descrição sobre trabalhos deste tipo pode ser vista em Pandey *et al.* (2000).

Como existem fecularias próximas à destilaria de álcool, a partir do farelo, também pode ser produzido etanol, principalmente para a produção de álcool fino, que possui um mercado diferenciado (LEONEL & CEREDA, 2000a).

Outra aplicação interessante para o álcool fino obtido a partir do farelo de mandioca está em reformadores que geram hidrogênio para células a combustível (CaCs) que, por sua vez, geram energia elétrica. Depois que algumas barreiras tecnológicas forem superadas, o hidrogênio poderá ser um produto promissor na matriz energética mundial dentro de poucas décadas. Através de parcerias com o Instituto Nacional de Tecnologia (INT), a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e o Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT/UNESP), estudos neste sentido vem sendo coordenados pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

2.3. Amido

O amido pode ser encontrado como carboidrato de reserva em diversos vegetais (% do peso seco): grãos de cereais (40-90), tubérculos (65-85), leguminosas (30-50) e frutas imaturas ou verdes (40-70) (DENARDIN & SILVA, 2009).

2.3.1. Composição química

O amido é um homopolissacarídeo contendo cadeias de amilose (15-20%) e amilopectina (80-85%). A fécula (ou amido) de mandioca apresenta variação mais estreita que a composição geral do amido, possuindo 18-19% de amilose e 81-82% de amilopectina (SPIER, 2005, p.36).

O polímero amilose é ordenado linearmente, sendo formado por unidades de α -D-glicopiranosose unidas por ligações α -(1,4). O componente ramificado, amilopectina, é formado pelas mesmas unidades de glicose ligadas em α -(1,4) e 4% a 6% delas unidas em α -(1,6), o que confere aspecto ramificado a este polímero. A proporção entre estes dois polímeros difere de acordo com a fonte botânica, a espécie e até mesmo dentro da própria variedade, dependendo do grau de maturação da planta (DENARDIN & SILVA, 2009).

A Figura 3 mostra os componentes estruturais do amido.

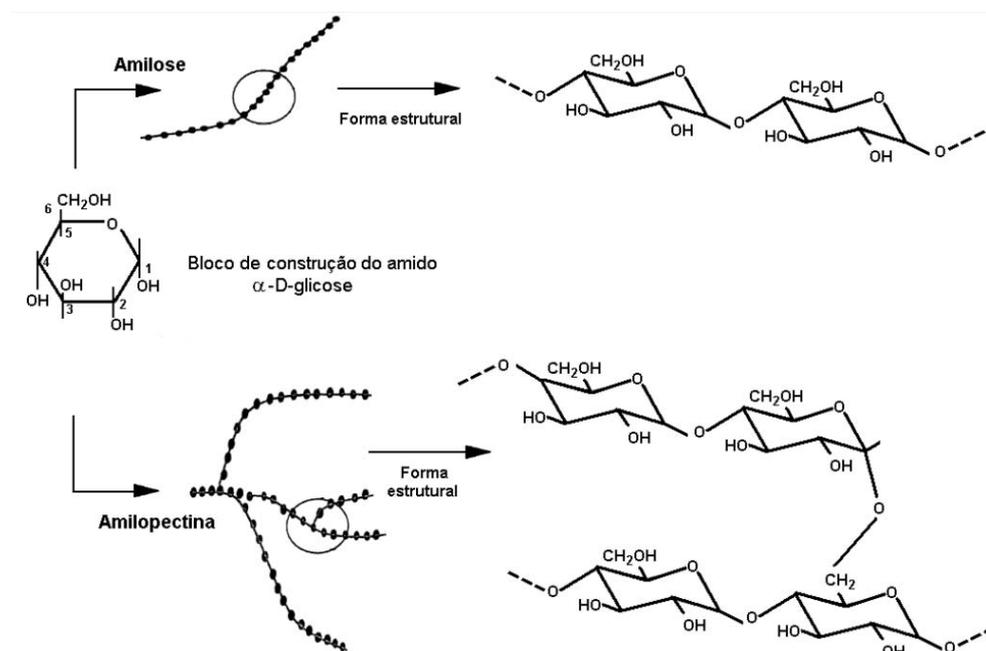


Figura 3 – Estrutura da amilose e da amilopectina.

Fonte: BENINCA, 2008.

A amilose e a amilopectina, ao serem hidrolisadas, se rompem, transformando-se em dextrinas cada vez mais simples até formar a glicose (TORRES, 2009, p. 18). De forma mais específica, a desconstrução e a despolimerização do grão de amido a glicose são resultado da hidrólise das ligações α -(1,4) e α -(1,6) entre os monômeros de glicose (ROBERTSON *et al.*, 2006).

2.3.2. Gelatinização e retrogradação

O amido pode inchar (10-20%) quando em contato com a água fria, sendo este processo reversível pela secagem (DENARDIN & SILVA, 2009; TORRES, 2009). No entanto, as suas propriedades físico-químicas podem ser modificadas por diversos tipos de tratamentos (GOMES *et al.*, 2010). O aquecimento do amido com água faz com que ele inche irreversivelmente (BENINCA, 2008).

Este fenômeno é denominado gelatinização, um conjunto de mudanças envolvendo a hidratação, o inchamento, a ruptura granular e a solubilização das moléculas de amido, aumentando a susceptibilidade deste à ação hidrolítica das enzimas. A estrutura cristalina é rompida em excesso de água, geralmente maior que 60% (MUCCILLO, 2009). Estas moléculas de água formam ligações de hidrogênio entre a amilose e a amilopectina, que ao exporem os seus grupos hidroxil, provocam elevação no grau de inchamento assim como na solubilidade do grânulo. À medida que os grânulos se expandem, a amilose passa da fase intergranular para a fase aquosa (lixiviação), aumentando substancialmente as propriedades reológicas do sistema (DENARDIN & SILVA, 2009). Por isso que há o aumento da viscosidade de um meio contendo amido, após a sua esterilização (NIGAM & PANDEY, 2009) A gelatinização possui uma ampla faixa de temperatura, que varia de acordo com a fonte de amido e dentre os inúmeros fatores que afetam a temperatura de gelatinização, a água é o principal deles. Quanto menor a quantidade de água, maior a temperatura de gelatinização (VAN DER VEEN *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2003; BJÖRCK *et al.*, 1994) Industrialmente,

usa-se a menor quantidade de água possível com vapor sob pressão, para economizar energia (MACHADO & ABREU, 2006).

A retrogradação é outro fenômeno importante que ocorre com o aquecimento do grânulo de amido, sendo geralmente notado através da textura do meio quando o amido gelatinizado é armazenado e resfriado. No entanto, este fenômeno é complexo e varia segundo o pH, a temperatura, o tempo de armazenamento, fonte de amido, condições de processamento e presença de outros componentes, tais como lipídios, eletrólitos e açúcares (DENARDIN & SILVA, 2009).

Certos grupos de cadeias de amilopectinas podem favorecer ou inibir a retrogradação da mesma, dependendo da maior ou menor formação de duplas hélices durante este fenômeno. A influência da amilose na retrogradação vem aos poucos sendo elucidada (VANDEPUTTE *et al.*, 2003). Existe a possibilidade de que ela se encontre complexada com lipídios. Os complexos amilose-lipídeos – LAM – *lipid-amylose complexes* – são formados durante um tratamento hidrotérmico ou numa gelatinização e se encontram em grande quantidade, em comparação à sua forma livre – FAM – *free amylose* (DENARDIN & SILVA, 2009).

Diversas técnicas avaliam o comportamento dos grânulos em relação à gelatinização: difração de raios X, microscopia com luz polarizada e calorimetria diferencial de varredura (DSC – *differential scanning calorimetry*), etc. Outros equipamentos indicam as propriedades viscográficas do amido durante o seu aquecimento: o viscoamilógrafo de Brabender e o visco-analisador rápido (RVA – *rapid visco-analyser*). As propriedades viscográficas do amido (temperatura de pasta, tempo de pico, viscosidade de pico, quebra, retrogradação e viscosidade final) podem ser obtidas através de um viscoamilograma (Figura 4) e variam de acordo com a fonte vegetal. Altas viscosidades de pico indicam grande capacidade para reter água, antes dos grânulos se romperem. Uma maior viscosidade de quebra representa menor resistência à temperatura, ou seja, está relacionada à baixa temperatura de pasta (de gelatinização) e menor tempo de pico. Altos valores de retrogradação e viscosidade final apontam para a elevada tendência das cadeias de amido se associarem novamente, formando produtos finais mais viscosos (DENARDIN & SILVA, 2009; HORIMOTO & CABELLO, 2007; SINGH *et al.*, 2003). A

viscosidade do meio pode ser alterada, por exemplo, por lipídios, proteínas, incorporação de emulsificantes e ação de enzimas (COLLARES, 2011).

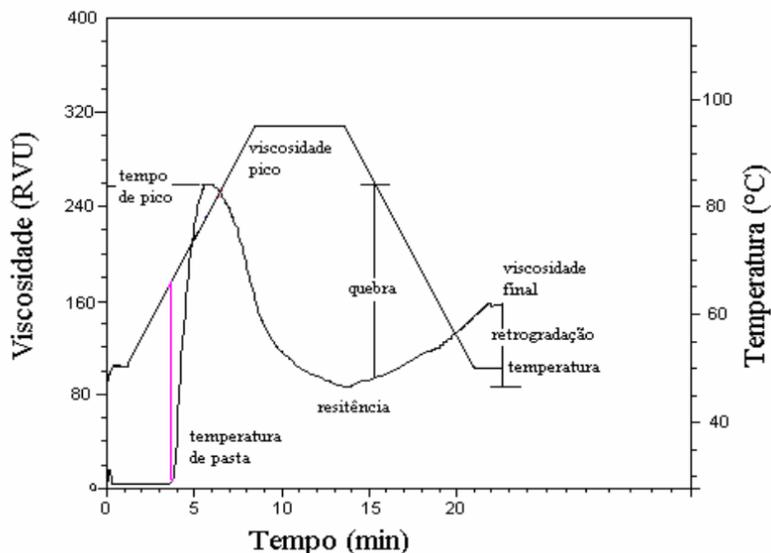


Figura 4 – Viscoamilograma típico de uma amostra de amido de mandioca obtido no RVA (*Rapid Visco Analyser*).

Fonte: HORIMOTO & CABELLO, 2007.

2.4. Hidrólise enzimática de substrato amiláceo

As enzimas são proteínas de grande especificidade (SPIER, 2005), que agem como biocatalisadores, diminuindo a energia de ativação da reação, e, conseqüentemente, acelerando todas as reações metabólicas energeticamente possíveis (TORRES, 2009). As enzimas que hidrolisam o amido podem ser classificadas como amilolíticas (Figura 5), atuando nas ligações glicosídicas do tipo α -(1,4) e α -(1,6) presentes no amido. Dois grupos destas enzimas são bastante comuns, as endo e exoamilases, que quebram as ligações glicosídicas das regiões mais internas e externas, respectivamente. As α -amilases, β -amilases, amiloglicosidases e isoenzimas são exemplos de amilases que podem ser extraídas de plantas, bactérias, fungos e animais. O mecanismo de catálise difere de uma enzima para outra (CAMILI, 2010; CAMILI, 2007).

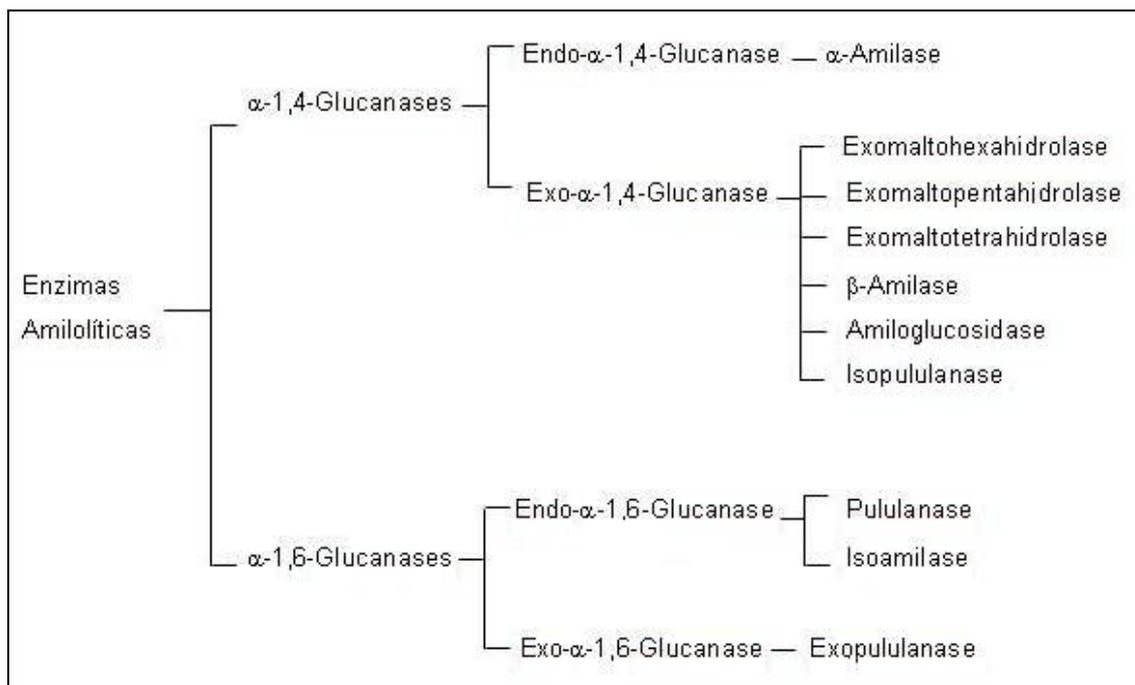


Figura 5 – Classificação das enzimas amilolíticas.

Fonte: SPIER, 2005.

A endo- α -1,4-glucanase (α -amilase) não cliva ligações α -(1,4) próximas de ligações α -(1,6), produzindo, portanto, cadeias com três e seis unidades de glicose, conhecidas como dextrina-limite (principalmente, maltotrioses e isomaltoses). Já as enzimas endo- α -1,6-glucanase quebram somente as ligações α -(1,6), logo atuam melhor em substratos ricos em amilopectinas. As exo- α -1,4-glucanases rompem hidroliticamente a região externa do grupo não redutor; as β -amilases, em particular, originam cadeias com baixo peso molecular, na configuração β e as amiloglucosidases, por sua vez, geram dextrinas e, ao final da quebra de ligações α -(1,6) e α -(1,4), moléculas de D-glicose (CAMILI, 2010).

O amido é uma macromolécula não fermentescível pelas leveduras, portanto exige hidrólise prévia, por via química ou enzimática, sendo esta última a forma mais utilizada (DINIZ, 2008).

A hidrólise enzimática apresenta baixo consumo de energia, alto rendimento, seletividade e alta flexibilidade operacional (TORRES, 2009; ZANIN *et al.*, 2000). Entretanto, existem alguns fatores limitantes para o uso industrial de enzimas: elevado custo de investimento inicial, de enzimas, de trabalhadores especializados e de laboratórios sofisticados (HASHIM & DARWISH, 2010). O custo de enzimas, normalmente, só perde para o de

matéria-prima, por isso, a redução do preço da enzima é necessária para manter os benefícios trazidos ao poupar energia durante a etapa de hidrólise do amido (ROBERTSON *et al.*, 2006).

Embora a hidrólise ácida tenha como vantagem, a rápida taxa de reação, trabalha-se com catalisadores ácidos (HCl ou H₂SO₄) sob pressão e altas temperaturas para hidrolisar o amido de forma não específica, cujos subprodutos podem provocar efeitos inibitórios durante o crescimento da levedura, quando na etapa de fermentação (HASHIM & DARWISH, 2010; TORRES, 2009).

Tudo isso justifica a aplicação da hidrólise enzimática em diversos tipos de indústrias, tais como de detergentes e produtos de limpeza, têxteis, de alimentos e de papel e celulose (SPIER, 2005), inclusive aquelas produtoras de álcool a partir do amido (TORRES, 2009). É um processo influenciado por diversos fatores como tipo da enzima, tamanho de partículas, temperatura, pH, tempo de hidrólise, razão entre líquido e substrato e agitação (PURBA, 2009).

Diversas publicações destacam a utilização em conjunto (ação sinérgica) de enzimas em processos de hidrólise enzimática. As mais comuns envolvem endo e exoamilases, tais como α -amilases e glucoamilases; α -amilases e glucosidases; α -amilases e maltases; amiloglucosidases e pululanases; β -amilases e pululanases; misturas de enzimas comerciais, dentre outras. Na atuação em conjunto, cada evento endocatalítico aumenta o número de sítios no substrato para as enzimas exocatalíticas, levando a um aumento na taxa de conversão (ROBERTSON *et al.*, 2006).

Um exemplo desta prática pode ser vista em Wang, Powell & Oates (1996). Na Tabela 6, verifica-se grande diferença no grau de hidrólise para a tapioca (mandioca) tratada e não tratada com tampão de acetato de sódio (pH 3,5) e aquecimento a 60°C, quando as enzimas comerciais Termamyl⁷ e AMG⁸ são utilizadas juntas ao invés de separadamente.

⁷ *Thermostable α -amylase* - Termamyl (WANG, POWELL & OATES, 1996).

⁸ Amiloglucosidase ou glucoamilase - AMG

Tabela 6 – Grau de hidrólise (G.H.) durante 32h de amido de tapioca (mandioca) tratado e não tratado com tampão de acetato de sódio, pH 3,5 e aquecimento a 60°C

Amido	Enzima	Tratado – G.H. (%)	Não tratado – G.H. (%)
Tapioca (Mandioca)	AMG	73	36
	Termamyl	29	12
	AMG + Termamyl	100	84

Fonte: WANG, POWELL & OATES, 1996

Quando a ação sinérgica entre Termamyl e AMG é empregada, as principais etapas de conversão enzimática do amido são liquefação e sacarificação. Na liquefação, a 90-100°C, a Termamyl (α -amilase) hidrolisa as ligações glicosídicas α -(1,4) no amido, reduzindo rapidamente a viscosidade do gel e produzindo maltodextrinas. Estas são sacarificadas pela AMG (amiloglucosidase), produzindo uma variedade de açúcares (SADEGHI *et al.*, 2008).

Teoricamente, após o ataque da α -amilase sobre a amilase, chega-se a 87% de maltose e 13% de glicose e, sobre a amilopectina, obtêm-se 73% de maltose, 8% de isomaltose e 19% de glicose. Todavia, num sistema fechado estes valores não são alcançados, pois a maltose liberada inibe a atuação da α -amilase. Caso oposto ao da destilaria que trabalha com “sistema aberto”, ou seja, a maltose é hidrolisada a glicose pelas enzimas das leveduras, sendo posteriormente, transformada em etanol e CO₂ (SPIER, 2005).

Quando as moléculas de glicose são formadas ao final da hidrólise enzimática, a viscosidade pode aumentar em um fator de 20 vezes acima de seu valor na pasta de amido inicial (ROBERTSON *et al.*, 2006).

No trabalho de Camili (2010), as enzimas comerciais Termamyl e AMG são descritas, de um modo geral. De acordo com esse trabalho, a atividade das preparações enzimáticas é específica para cada produtor ou comerciante, uma vez que as enzimas exigem substratos, temperaturas e pH variados, o que dificulta a comparação desta informação na ficha técnica dos produtos. Entretanto, existem tentativas de padronização internacional.

O preço destas enzimas varia de acordo com o volume ou o peso comprado e também com a cotação do dólar (LEONEL & CEREDA, 2000a).

Segundo informações da Novozymes S/A (2013), as enzimas comerciais Termamyl 2X⁹ (Kg) e AMG 300L¹⁰ (L) têm um preço médio de R\$ 25,51.

Na Tabela 7, estão apresentados os volumes de enzimas necessários à hidrólise de fontes amiláceas. Nota-se que pequenas quantidades de enzimas são utilizadas.

Tabela 7 – Quantidade de enzima comercial necessária para a hidrólise enzimática de fontes amiláceas

Referência	Termamyl 2X	AMG 300L
Santos, R. <i>et al.</i> (2010)	0,162 mL/g FM	0,066 mL/g FM
Barcelos <i>et al.</i> (2011)	0,020 mL/g grão sorgo	0,040 mL/g grão sorgo
Saito & Cabello (2006)	0,250 mL/g FM	0,250 mL/g FM

FM: Farelo de mandioca

Entretanto, uma maior quantidade de enzimas é requerida para a digestão do amido sólido do que para a hidrólise do amido solúvel. A necessidade de uma maior concentração de enzimas, em oposição à sua diluição, pode ser devida à localização do substrato (amilose e/ou amilopectina) na superfície do grânulo e também aos eventos catalíticos menos efetivos durante a digestão do amido, como acontece quando a agitação não é empregada. (ROBERTSON *et al.*, 2006).

Van der Veen *et al.* (2006) investigaram a hidrólise do amido com pouca quantidade de água (<43% água) e as implicações deste processo nas propriedades do produto, utilizando extrusoras para misturar o meio.

Saito & Cabello (2006) definem o rendimento do processo de hidrólise como a percentagem de amido que foi retirado do farelo e convertido a glicose, assumindo que 100,0g de amido produzem 100,0g de glicose, conforme a Equação 1:

$$\text{Rend (\%)} = \frac{\text{conc. glicose no hidrolisado}}{\text{conc. amido no farelo}} \times 100 \quad (1)$$

⁹ α-amilase obtida de *Bacillus licheniformis*

¹⁰ Amiloglucosidase extraída de *Aspergillus niger*

2.5. Fermentação alcoólica

O preço do petróleo continua subindo e cada vez mais há uma decrescente disponibilidade geográfica deste combustível fóssil. Adicionalmente, as regulamentações governamentais vêm se tornando cada vez mais rigorosas, para minimizar as emissões de poluentes na atmosfera. Por isso, a utilização de biocombustíveis derivados de fontes renováveis tem atraído muita atenção recentemente. O bioetanol é um combustível renovável largamente utilizado, pois é superior aos de origem fóssil, em termos de segurança ao suprimento energético e consciência ambiental. Entretanto, do ponto de vista financeiro, o bioetanol é normalmente mais caro para ser produzido do que a gasolina. Neste sentido, para melhorar a competitividade deste biocombustível, aperfeiçoamentos na tecnologia de processo e a seleção de substratos de menor custo são dois fatores críticos que precisam ser totalmente otimizados e integrados (YINGLING *et al.*, 2011).

A Novozymes, empresa que supre mais de 50% da demanda de enzimas no mundo, endossa o que foi dito em relação ao processo de produção de bioetanol, afirmando que ele ainda é mais caro que o da gasolina, devido ao elevado preço das enzimas envolvidas, por exemplo, num bioprocessamento que converte milho à etanol. No entanto, a tendência é que o custo dessas enzimas caia na medida em que haja melhora no processo de fermentação para a obtenção das mesmas (BIELLO, 2011).

À parte das biomassas clássicas como a cana-de-açúcar, o milho, o trigo e a mandioca, os resíduos agroindustriais lignocelulósicos e/ou amiláceos despontam como biomassa alternativa para ser processada em álcool por via fermentativa, utilizando geralmente leveduras do gênero *Saccharomyces*.

Tem-se conhecimento de, aproximadamente, 500 espécies de leveduras. As espécies do gênero *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, dentre outras, destacam-se como produtoras de etanol. Das leveduras alcoólicas, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais importante, possuindo amplo espectro de utilização: produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol e demais produtos (ERNANDES & GARCIA-CRUZ, 2009).

As leveduras são fungos unicelulares não filamentosos podendo ter a forma esférica, ou oval e suas dimensões variam de 1 a 5 μm de largura e 5 a 12 μm de comprimento (CAMILI, 2010; TORTORA, FUNKE & CASE, 2005).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* não produz, naturalmente, as enzimas necessárias para hidrolisar o amido, como a α -amilase e a glucoamilase, por isso, uma hidrólise deste substrato é requerida antes da fermentação alcoólica (HASHEM & DARWISH, 2010).

Especificamente, a levedura consegue assimilar mono, di e trissacarídeos. Entretanto, como ela é um ser aeróbio facultativo, dependendo da condição ambiental na qual se encontra, grande parte destes açúcares pode ser transformada em biomassa, CO_2 e H_2O , quando em aerobiose, ou convertida a etanol e CO_2 , em anaerobiose, que caracteriza a fermentação alcoólica. No metabolismo anaeróbio, estima-se que 5% dos açúcares sejam desviados para formar produtos secundários da fermentação, tais como glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores e acetaldeídos.

A glicólise é a principal rota metabólica deste tipo de fermentação. Uma glicose é quebrada, após 10 reações sucessivas, em duas moléculas de piruvato. O piruvato é descarboxilado para formar acetaldeído, que ao ser reduzido, transforma-se em etanol. A produção de etanol, sob o ponto de vista bioquímico, é importante para regenerar o NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e manter a via glicolítica funcionando para consumir mais glicose, fonte de energia para o micro-organismo. Consequentemente, o etanol é lançado no meio, eliminando micróbios concorrentes. Uma vez que a glicose é totalmente consumida, a repressão enzimática provocada por ela cessa e a enzima ADH2 (álcool desidrogenase 2) passa a ser formada para transformar o etanol em acetaldeído, que por sua vez é convertido em acetil CoA, substrato para o ciclo do ácido cítrico (McKEE & McKEE, 2011).

Como já mencionado, na indústria de álcool, normalmente, utilizam-se as leveduras de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, prensadas ou secas. A fim de aumentar a produtividade e o rendimento (i.e., converter rapidamente açúcares fermentescíveis em álcool, com baixa produção de substâncias secundárias), empregam-se leveduras selecionadas. É de interesse que as leveduras industriais apresentem resistência a múltiplos estresses, tais como tolerância a etanol, à acidez, ao sulfito, ao alumínio, à contaminação

bacteriana, dentre outros, além de termo e osmotolerância (BASSO, BASSO & ROCHA, 2011; BELLUCO, 2001).

Os processos industriais de fermentação alcoólica podem ser conduzidos em batelada (ou descontinuamente), em batelada alimentada ou continuamente. Na produção de álcool de mandioca, os processos descontínuos e contínuos com recirculação de células são mais indicados, pois a reciclagem da levedura faz com que a concentração deste fermento aumente, com concomitante aumento na produtividade (LIMA, BASSO & AMORIM, 2001).

2.5.1. Usinas de álcool amiláceo

A experiência brasileira com a geração de etanol de mandioca data da década de 1930. Contudo, à medida que o álcool da cana-de-açúcar foi ganhando aperfeiçoamento tecnológico a partir da década de 1970 a produção de etanol da mandioca foi sendo abandonada, sem grandes investimentos e estudos. Nesta mesma época, a usina de Curvelo – MG foi instalada com capacidade para fornecer 60 mil litros/dia de etanol de mandioca e, mais tarde, nos anos 80 passou para o controle da Petrobrás. Ainda assim, atualmente, a mandioca não concorre com a cana-de-açúcar em igualdade devido à sua baixa produtividade agrícola (em média, 13 ton/ha.ano) e ao fato de não possuir açúcares diretamente fermentescíveis, necessitando de hidrólise prévia. Entretanto, a viabilidade deste tubérculo para a produção de etanol pode aumentar com o emprego de variedades mais produtivas cuja produção excede 20 ton/ha.ano (SANTANA, 2007; SOUZA, 2005). Acredita-se que o Brasil produza cerca de 20% de seu etanol combustível a partir desta fonte amilácea (UCLA, 2011).

Para Bringhamti & Cabello (2005), o álcool hidratado não difere quimicamente quando obtido de diferentes matérias-primas (cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca), no entanto, podem ser observadas impurezas inerentes a cada insumo e ao grau de purificação deste produto. O uso farmacêutico do etanol é considerado o mais nobre que o combustível, sendo

utilizado como um veículo inerte, cujas características não interferem na composição do produto final. Nestes casos, após a destilação do mosto fermentado, o destilado é retificado para praticamente eliminar os aldeídos formados durante a fermentação alcoólica.

Nas usinas de álcool, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são frequentemente usadas e devem ter boa utilização do açúcar (altas eficiências de fermentação), tolerância ao álcool e estabilidade genética. As qualidades extras são: capacidade de suportar mostos com alta concentração inicial de açúcar (25%) e elevadas temperaturas, além de assimilar trissacarídeos, dextrinas e amido. Sabe-se que linhagens convencionais de *S. cerevisiae* não consomem amido, mas a engenharia genética traz a possibilidade de introduzir genes codificados de enzimas amilolíticas (α -amilases e glucoamilases) em leveduras desta espécie, de forma separada ou simultânea. *S. cerevisiae* glucoamilase, por exemplo, tem um recorte genético de *Aspergillus niger*, micro-organismo produtor de glucoamilases. Amplia-se, desta forma, a capacidade fermentativa desta levedura e diminui-se o custo de produção¹¹ do etanol, pois dispensa a necessidade prévia de sacarificação com ácido e/ou enzima. Entretanto, os desenvolvimentos de manipulação genética de leveduras ao nível industrial estão aquém do que se observa em laboratórios universitários e outros laboratórios de pesquisa (LATORRE-GARCÍA *et al.*, 2005; SPENCER & SPENCER, 1997; SPENCER & SPENCER, 1983).

A tolerância a múltiplos estresses da levedura *S. cerevisiae* em relação à alta ou baixa temperatura, etanol e estresse oxidativo foram alcançados através da técnica da evolução adaptativa, que consiste em provocar o crescimento contínuo de uma cultura que está sob uma pressão seletiva apropriada para formar fenótipos com determinadas características (ÇAKAR *et al.*, 2012; SAUER, 2001). A relação de alguns estresses e a produção de solutos compatíveis da célula, que ajustam os processos químicos citoplasmáticos (MADIGAN *et al.*, 2010), foram elucidados por Eleutherio, Araujo & Panek (1993).

¹¹ O custo de α -amilases bacterianas termoestáveis é de cerca de 12% do total de matéria-prima, sendo o custo de matéria-prima e de processo em torno de 50-70% do custo do etanol combustível (SPENCER & SPENCER, 1997).

A produção de etanol a partir de amiláceos não é conhecida, muito menos difundida, no Brasil, uma vez que praticamente toda a matriz energética brasileira baseada em biomassa é focada na cana-de-açúcar. No entanto, a obtenção de etanol empregando matéria-prima amilácea (por exemplo, grãos de cereais), vem sendo adotada e estudada na Europa, Estados Unidos e países Asiáticos, principalmente em países detentores de alta tecnologia, como Alemanha, Dinamarca, Bélgica, Suécia e França (INSTITUTO EUVALDO LODI - NÚCLEO CENTRAL, 2008; SOUZA, 2005).

Segundo Camili (2010), a produção industrial de etanol de mandioca é semelhante à geração desse álcool a partir de cereais, envolvendo etapas de preparação da matéria-prima (pesagem, lavagem, descascamento); desintegração; dextrinização e sacarificação; fermentação e destilação.

A implantação de indústrias alcooleiras de mandioca, cultura pouco exigente em fertilidade, pode melhorar a distribuição de renda do país, caso o escoamento da produção se torne viável. Além disso, a produção de etanol da mandioca é tanto econômica quanto sustentável, sendo um processo com eficiência energética¹² e de energia renovável (MARX & NQUMA, 2013; CAMILI, 2010; DE VRIES, *et al.*, 2010).

Os processos de fermentação ou de cultivo microbiano podem ser classificados de duas formas: fermentações submersas (FS), baseadas em fermentações líquidas, e em fermentações em estado sólido (FES), onde há total ou quase ausência de água livre, utilizando matérias-primas como a mandioca ou até mesmo o seu resíduo sólido, o farelo de mandioca, (BHARGAV *et al.*, 2008; RAY *et al.*, 2008; PANDEY *et al.*, 2000).

Outra classificação se dá em relação às etapas de hidrólise e de fermentação. Métodos relatados por Kongkiattikajorn, (2012) para a produção fermentativa de etanol a partir do amido incluem:

(a) a hidrólise e fermentação em separado (HFS), também conhecido como fermentação convencional (FC), fazendo o uso de enzimas em condições específicas durante o processo de hidrólise, anterior à fermentação conduzida por determinado micro-organismo (Figura 6a);

¹² A eficiência energética representa o meio mais barato e mais seguro de reduzir emissões de carbono e de poupar dinheiro para outros usos produtivos (EXPERT GROUP ON ENERGY EFFICIENCY, 2007).

(b) a simultânea sacarificação e fermentação (SSF), misturando a cultura amilolítica e o micro-organismo produtor de etanol (Figura 6b);

(c) a liquefação, sacarificação e fermentação simultânea (LSFS), utilizando enzimas amilolíticas de bactérias e de fungos junto com a levedura de fermentação (Figura 6c).

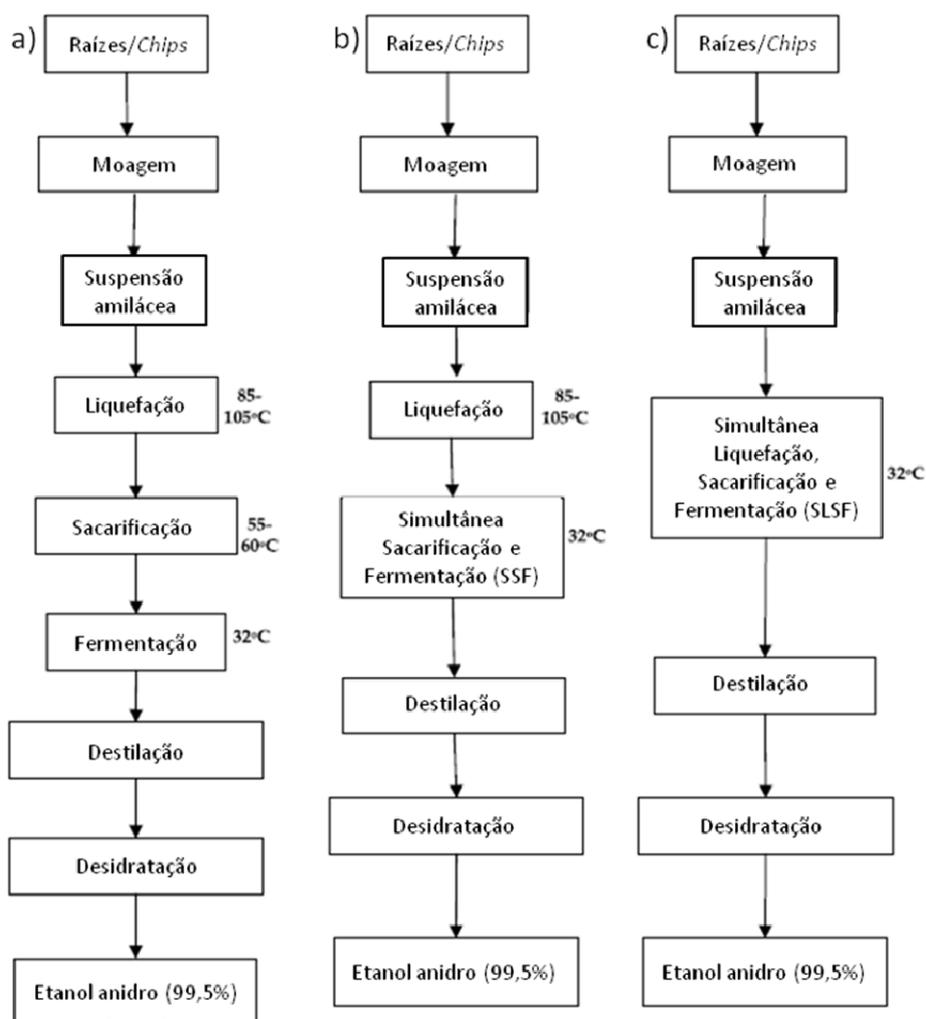


Figura 6 – Processos de produção de etanol a partir de mandioca, (a) HFS, Hidrólise e Fermentação em Separado ou Convencional, (b) SFS, Sacarificação e Fermentação Simultânea e (c) LSFS, Liquefação, Sacarificação e Fermentação Simultânea.

Fonte: SRIROTH, WANLAPATIT & PIYACHOMKWAN, 2012.

Cabe destacar, no entanto, que a mistura de culturas ou a adição de enzimas amilolíticas ao micro-organismo de fermentação dificulta o estabelecimento de condições ótimas da cultura na produção de álcool. Em sistemas com micro-organismos misturados (SFS e LSFS), o rendimento de

etanol decresce, porque boa parte do amido é consumida para o crescimento do organismo amilolítico. Por outro lado, como ocorre na HFS, o emprego de enzimas encarece o processo (KONGKIATTIKAJORN, 2012).

A vantagem do processo de hidrólise e fermentação em separado (HFS) consiste na possibilidade de se trabalhar com temperaturas otimizadas tanto na etapa de hidrólise enzimática quanto na de fermentação (SANTOS, J. *et al.*, 2010). As etapas dessa forma convencional são: moagem (que pode ser a seco ou por via úmida), peneiramento e, depois, a hidrólise empregando as enzimas α -amilase (90-105°C) e a glucoamilase (58-60°C). A levedura é, então, adicionada à mistura sacarificada para fermentar os açúcares a etanol e CO₂. Se um processo contínuo é usado, a mistura de fermentação segue para diversos fermentadores até estar completamente fermentada. Num processo em batelada, o mosto fica em apenas um tanque por aproximadamente 48h. Depois, o mosto com cerca de 10% em álcool, açúcares não fermentados e levedura é bombeado para a destilaria, onde o álcool é obtido no topo da coluna de destilação com uma concentração em torno de 96%. A vinhaça, que fica no fundo da coluna, vai para a área de processamento de coprodutos (IBETO, OFOEFULE & AGBO, 2011). Por último, o azeótropo etanol-água (96%) pode passar por um processo de desidratação, transformando-se no álcool anidro (99,5%).

Conforme Sriroth *et al.* (2010), na Tailândia, a produção de álcool a partir da mandioca por diversos processos de fermentação (CF ou HFS, SFS e LSFS) fornece, ao final de aproximadamente 50h de fermentação, concentrações alcoólicas em torno de 8-10% (p/v) no mosto, que é destilado e desidratado, resultando no etanol anidro (99,5%). Processos conhecidos como *Very High Gravity* (VHG) utilizam meios de fermentação que iniciam com mais de 30% de açúcares (ou sólidos solúveis) e alcançam elevadas concentrações de etanol (~14,6-18%), o que minimiza o custo energético da etapa de destilação e também dobra a capacidade da planta. De acordo com estudos, processos que de alguma forma poupam energia (LSFS e VHG), têm sido avaliados com êxito em escala piloto (1000 L volume de trabalho) e encontram-se em processo de transferência para a escala industrial.

Esta equipe relata que, embora a indústria do etanol produzido a partir da mandioca seja emergente, ela é promissora, uma vez que a indústria da

mandioca na Tailândia tem experiência de longa data, infraestrutura facilitada e possui incentivos para melhorar tecnologicamente. Por isso, a Tailândia demonstra grande capacidade para negociar seu conhecimento entre outros países onde há produção de mandioca.

Países como Tailândia, China, Indonésia, Nigéria, Gana e Moçambique já investem no uso industrial da mandioca para produzir etanol. Em Moçambique, por exemplo, foi inaugurada, em maio de 2012, uma destilaria com capacidade anual para fornecer 2 milhões de litros de etanol de mandioca. Numa escala global, podem ser produzidos 6000 Kton/ano deste álcool, se o uso da mandioca, que possui outros interesses industriais, for restringido para este setor (CÂMARA SETORIAL DA CADEIA PRODUTIVA DA MANDIOCA E DERIVADOS, 2012; CHICHERCHIO, 2012; KUIPER *et al.*, 2007).

Além da mandioca, outras fontes renováveis para a produção de bioetanol vêm sendo pesquisadas, muitas delas são resíduos agroindustriais amiláceos e celulósicos, que despontam como alternativa racional para solucionar ou mitigar o problema localizado de poluição industrial e de segurança alimentar (SAITO & CABELLO, 2006). O uso dessas fontes alternativas também pode estabilizar as frequentes oscilações do preço do bioetanol frente à gasolina, devido, em parte, à sazonalidade da cana-de-açúcar, principal insumo desse biocombustível no Brasil (SOBRINHO, 2012).

O farelo de mandioca, devido à grande porção de amido (~60%), é um exemplo de resíduo amiláceo que pode ser transformado num coproduto fibroso (20% em fibras) do processamento da fécula, trazendo os benefícios mercadológicos de uma indústria limpa para a produção de etanol. Na Tailândia, produz-se cerca de 340.000 ton/ano de farelo, com tendência a aumentar de quantidade (GAEWCHINGDUANG & PENGTHEMKEERATI, 2010; BRINGHENTI & CABELLO, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O farelo de mandioca (FM) empregado neste estudo foi fornecido pela *Halotek-Fadel Industrial Ltda* (Palmital/SP). O farelo foi recebido com cerca de 70% de umidade sendo, em seguida, triturado em moinho de martelo da marca *Persen* (modelo 3100). A moagem foi realizada nesse moinho que tem um sistema de peneiras (0,80 mm) acoplado e todo o material moído foi aproveitado, não tendo havido separação de frações (ANEXO 1).

3.1. Caracterização físico-química do farelo de mandioca

O teor de amido foi determinado pelo método DNS, após a hidrólise ácida (SANTOS, R. *et al.*, 2010), conforme descrito a seguir: 1g de amostra (farelo de mandioca ou amido, usado como branco) recebeu a adição de 5,0 mL de H₂SO₄ 1M e aquecimento a 100°C por 40min. Após resfriamento, o hidrolisado foi neutralizado com 5,0 mL NaOH 2M e, em seguida, foi centrifugado a 3000 rpm por 20 min. O sólido foi lavado três vezes com 5,0 mL de água destilada. Por fim, o volume do hidrolisado e das suas respectivas lavagens foi misturado em proveta de 50 mL, para medir a concentração de açúcares redutores totais (ART) pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), de acordo com procedimento adaptado de Miller (1959).

As análises de umidade, cinzas, proteínas e gorduras no farelo de mandioca seco foram realizadas nos Laboratórios de Físico-Química e de Minerais da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Utilizaram-se os seguintes procedimentos da AOAC (2010): método 931.04, 923.03, 2001.11 e 945.38, respectivamente.

3.2. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca

Para a hidrólise foram empregadas as enzimas comerciais Termamyl 2X (α -amilase) e AMG 300L (glucoamilase), doadas pela Novozymes, através da distribuidora LNF Latinoamericana. As condições de hidrólise foram definidas após a realização de ensaios preliminares.

Para os ensaios preliminares, foi realizado o pré-tratamento do FM seco dentro de *Erlenmeyer*, em autoclave a 120°C por 15 minutos. A hidrólise enzimática ocorreu sem ajuste de pH e sem agitação mecânica (sistema estático), após a mistura do farelo com as soluções enzimáticas. A eficiência da hidrólise enzimática foi medida por determinação dos açúcares redutores formados na reação pelo método do ácido dinitrosalicílico (Figura 7).

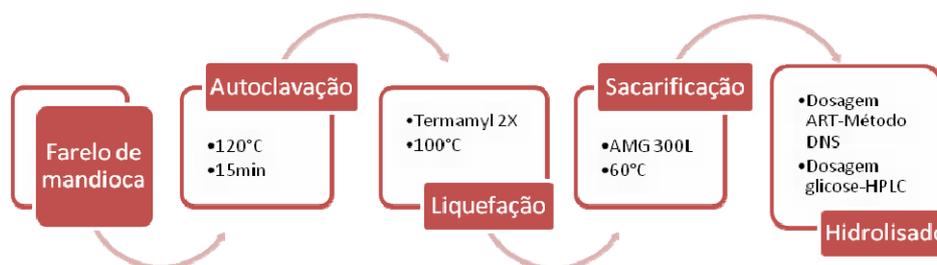


Figura 7 – Esquema de hidrólise enzimática.

Os testes preliminares para a escolha das condições de hidrólise foram inicialmente conduzidos em tubos de ensaios contendo 1g de FM acrescido de 0,079 mL de enzima Termamyl e 6 mL de água, ou seja, 0,133 mL Termamyl/g amido. O material foi aquecido a 100°C por 1h, para a liquefação do amido sendo, em seguida, resfriado até 60°C. Na sequência, adicionou-se 0,043 mL de enzima AMG e 1 mL de água (0,072 mL AMG/g amido) e a sacarificação transcorreu por 1,5h. O hidrolisado foi centrifugado a 3000 rpm por 20 min e o sólido lavado três vezes com 5,0 mL de água destilada. A concentração de glicose foi determinada pelo método do DNS. Esta metodologia foi baseada em estudos de Santos, R. *et al.* (2010), inclusive o pré-tratamento do FM descrito na seção anterior.

No escalonamento do processo de hidrólise promoveu-se uma alteração na etapa de extração, com a eliminação do procedimento de lavagem. A

hidrólise foi conduzida em *Erlenmeyer* de 1L com 160g de FM acrescido de Termamyl na etapa de liquefação e AMG na etapa de sacarificação, mantendo as mesmas concentrações enzimáticas, numa relação sólido:líquido de 1:4. Nessas condições não foi atingida uma concentração de açúcares que permitisse, após a fermentação, obter teores elevados de etanol, como desejado. Por este motivo, foi realizado um planejamento experimental do processo de hidrólise enzimática.

3.2.1. Planejamento experimental na hidrólise enzimática

Visando aumentar a concentração de açúcares no hidrolisado destinado à fermentação e, paralelamente, diminuir custos e tempo reacional, aplicou-se na etapa de hidrólise enzimática um planejamento experimental fatorial completo (2^4) com replicata no ponto central. A relação sólido:líquido foi 1:3. Os fatores avaliados foram concentração de Termamyl 2X, tempo de liquefação, concentração de AMG 300L e o tempo sacarificação (MONTGOMERY, RUNGER & HUBELE, 2004), cujos valores estão apresentados na Tabela 8. Neste planejamento, a análise estatística dos ensaios foi feita no programa *Minitab*® 16, com 95% de confiança.

Tabela 8 – Valores reais e codificados de planejamento fatorial aplicado à hidrólise

Fator Nível	1ª etapa - Liquefação		2ª etapa – Sacarificação	
	A: [Termamyl] (mL/g amido)	B: Tempo de liquefação (h)	C: [AMG] (mL/g amido)	D: Tempo de sacarificação (h)
-1	0,270	1	0,110	2
0	0,477	2	0,313	3
1	0,683	3	0,517	4

Nesta etapa, os ensaios foram realizados em *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 30g de FM. Na etapa de liquefação, o FM previamente tratado foi misturado a uma solução enzimática de Termamyl 2X (0,270-0,683 mL/g amido) e permaneceu a 100°C durante 1-3h. Em seguida, este material foi resfriado até 60°C e sacarificado com uma solução enzimática de AMG 300L

(0,110-0,517 mL/g amido) por 2-4h. Por último, a concentração de açúcares do filtrado foi quantificada pelo método do DNS.

A escolha dos possíveis fatores do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central foi baseada na literatura científica disponível. Selecionaram-se artigos publicados entre 1999 e 2011.

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática são: tamanho de partícula; relação sólido-líquido; temperatura; pH; velocidade de agitação; concentração enzimática; tempo de hidrólise; dentre outros. O tamanho de partícula não foi determinado, pois não houve separação de frações do farelo de mandioca moído. A relação sólido:líquido 1:3 estabelecida está de acordo com Barcelos *et al.* (2011). A temperatura foi fixada em 100°C (vapor saturado) na etapa de liquefação, apesar da ótima ser de 90°C (TORRES, 2009). Na etapa de sacarificação utilizou-se 60°C. Optou-se por não ajustar o pH, pois o uso de tampões encarece o processo. Ainda para minimizar custos, a hidrólise enzimática foi conduzida em sistema estático (sem agitação), usando altas concentrações enzimáticas, embora tenha sido verificado em Leonel & Cereda (2000a) e Santos, R. (2010), por exemplo, o uso de agitação e baixas concentrações enzimáticas.

Para estabelecer os níveis inferior e central das concentrações enzimáticas (de Termamyl 2X e de AMG 300L) do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central escolheram-se duas publicações que apresentaram as maiores cargas enzimáticas: Saito & Cabello (2006) e Santos, R. *et al.* (2010). A diferença entre estes níveis ajudou a definir o superior. As concentrações enzimáticas empregadas são da ordem de 10^{-4} a 3×10^{-1} mL de enzima/g amido ou 0,1 a 300 L/ton amido (BARCELOS *et al.*, 2011; LUCENA *et al.*, 2011; SANTOS, R. *et al.*, 2010; SAITO & CABELLO, 2006; LEONEL & CEREDA, 1999). Entretanto, os níveis máximos de Termamyl 2X e AMG 300L excedem, respectivamente, 1,4 e 1,6 vezes a concentração utilizada nos pontos centrais do planejamento. Os tempos transcorreram nos menores tempos encontrados para liquefação e sacarificação: 1-3h e 2-4h, respectivamente (COLLARES *et al.*, 2012; CAMILI, 2010; SANTOS, R. *et al.*, 2010; RESENDE & OLIVEIRA, 2009; NEVE, BROETTO & MARCHESI, 2008; SAITO & CABELLO, 2006; LEONEL & CEREDA, 2002).o

3.3. Fermentação alcoólica

Os ensaios de fermentação foram conduzidos com os seguintes objetivos: 1) definir a linhagem a ser usada nos ensaios posteriores, a melhor forma de propagação dos micro-organismos empregados na fermentação alcoólica e os perfis de crescimento que ajudaram a definir o tempo de propagação do inóculo; 2) realização de ensaios preliminares (Ensaio 1, 2, 3 e 4) para determinar as melhores condições de hidrólise enzimática do farelo de mandioca; 3) realização de ensaios finais de fermentação (Ensaio 5 e 6) para definir as condições de escalonamento do processo fermentativo.

3.3.1. Micro-organismos

Foram empregadas duas linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: uma comercial isolada de fermento biológico fresco da marca *Fleischmann* e a cepa Hansen BY4741, fornecida pelo Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), denominada álcool resistente (AR).

Segundo informações extraídas de Araújo (2013), a linhagem Hansen BY4741 pode ser adquirida na coleção *Euroscarf (European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis)*, localizada em *Frankfurt*, na Alemanha. A linhagem comercial, isolada do fermento de padaria *Fleischmann* (AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos LTDA, Brasil), de acordo com a literatura, possui o menor desempenho fermentativo quando comparada com linhagens industriais (BATISTOTE *et al.*, 2010; BERGAMO, ANDRES & URIBE, 2013). Por isso ela foi escolhida para ser comparada à levedura Hansen BY4741.

As cepas foram mantidas a 4°C, após repique para gelose YEDP (Yeast Extract Dextrose Peptone) - contendo 1% de extrato de levedura, 1% de peptona de carne, 2% de glicose, 2% de ágar e pH 5,0 - e incubação a 30°C por 72h.

3.3.2. Preparo do inóculo

O inóculo para a fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* comercial foi preparado em *Erlenmeyer* contendo 100 mL de meio YEDP. Esses frascos foram incubados em agitador de bancada (*Tecnal*, modelo TE-420) a 100 rpm sob temperatura controlada de 30 °C. Após 12 ou 24 horas, o conteúdo dos frascos foi centrifugado e o inóculo padronizado. O inóculo assim preparado foi denominado “não adaptado”.

O inóculo de *S. cerevisiae* AR foi preparado tanto da forma descrita para a linhagem comercial quanto com uma pré-adaptação da linhagem. A pré-adaptação se deu por inoculação em *Erlenmeyers* contendo 100 mL de meio a base de farelo de mandioca hidrolisado diluído (2% de açúcares redutores) e acrescido de 1% de peptona de carne e 1% de extrato de levedura, a pH 5,0. O inóculo preparado dessa forma foi denominado “pré-adaptado”.

A Figura 8 mostra a sequência de etapas do preparo do inóculo. Ao final do crescimento, as células microbianas foram centrifugadas, em condições assépticas, a 3000 rpm por 5 min. A seguir, procedeu-se à lavagem das células com solução salina (NaCl 0,85%), por duas vezes. O inóculo consistiu de aproximadamente 3g de decantado para cada litro de meio a fermentar. Segundo Pacheco (2012), o inóculo é o volume de suspensão de micro-organismo numa concentração ideal capaz de garantir a fermentação do mosto. Industrialmente, o inóculo chega a alcançar concentrações de 10 a 12% do volume da dorna.

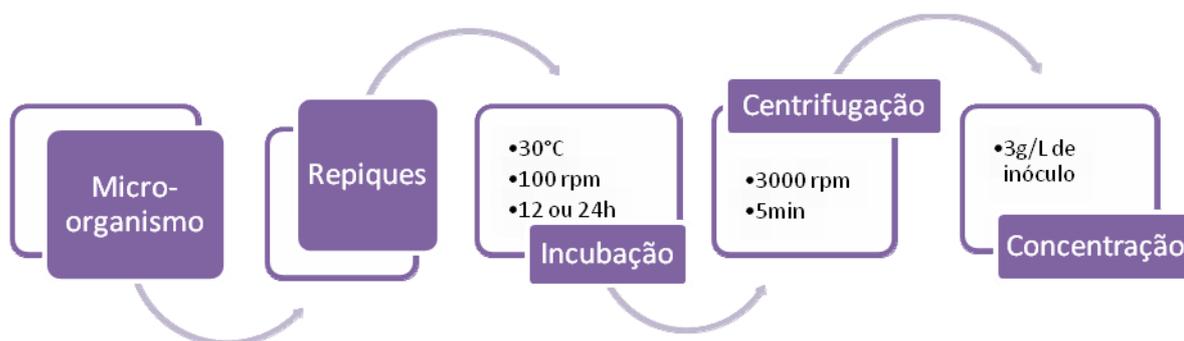


Figura 8 – Esquema do Preparo do Inóculo.

3.3.3. Ensaio de fermentação alcoólica

Os ensaios foram conduzidos em regime de batelada, no fermentador *Biostat APlus* de 3L da *Sartorius* (ANEXO 1), utilizando 1L de mosto, enriquecido com extrato de levedura (1%) e peptona de carne (1%). A operação do biorreator foi realizada via *software* próprio, na temperatura de 30°C, agitação de 100 rpm e pH 5,5, controlado pela adição de H₂SO₄ 1M (Figura 9).

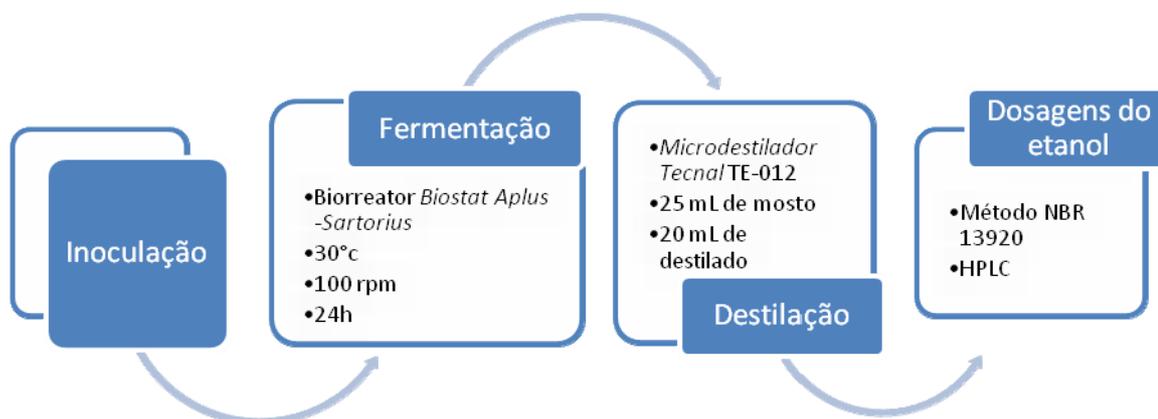


Figura 9 – Esquema da fermentação alcoólica e da destilação do mosto.

Durante os ensaios preliminares 1, 2, 3 e 4, foram coletadas até 8 amostras, num período de 24h de processo, para a dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS e para a quantificação de células por método turbidimétrico. Além disso, duas ou três amostras do mosto fermentado,

recolhidas em 10, 24 e/ou 30h, foram acondicionadas em tubos *Falcon* de 50 mL, resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 4000 rpm por 5 min. De cada sobrenadante obtido, uma alíquota de 25,0 mL para destilação por arraste a vapor em microdestilador *Tecnal* TE-012 (ANEXO 1) e posterior determinação do teor alcoólico do destilado pelo método do dicromato de potássio, segundo a NBR 13920 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1997). Nos ensaios finais 5 e 6, doze amostras foram recolhidas durante 30h para a dosagem de glicose e etanol por HPLC e quantificação celular.

3.3.3.1. *Ensaio 1 e 2: Comparação de linhagens em meio YEDP*

Os ensaios 1 e 2 tiveram como objetivo verificar se a tolerância ao etanol da linhagem AR era, de fato, superior à da linhagem comercial. Foi utilizado meio líquido YEDP (20% de glicose), esterilizado a 120°C por 15 minutos. O inóculo consistiu de *S. cerevisiae* comercial ou *S. cerevisiae* AR, crescidas por 24h em meio YEDP (2% em glicose), na concentração de 3 g/L (massa seca).

3.3.3.2. *Ensaio 3 e 4: Linhagem selecionada em meio hidrolisado*

Os ensaios 3 e 4 visaram testar a influência da pré-adaptação da levedura AR, na fermentação do hidrolisado enzimático de FM. O hidrolisado foi fortificado, esterilizado e fermentado a 100 rpm. Foram utilizados cerca de 3 g/L (massa seca) da cepa AR, crescida por 24h em meio YEDP (2% de glicose – meio não adaptado) ou meio hidrolisado (2% em açúcares – meio pré-adaptado).

3.3.3.3. *Ensaio 5 e 6: Inóculo não adaptado ao hidrolisado de FM*

Estes ensaios foram realizados com um litro de hidrolisado fortificado e não esterilizado contendo 0,05% (p/v) de Tween 80. O meio de fermentação foi congelado para evitar contaminações e aquecido em banho-maria a 30°C antes de ser inoculado. A fermentação ocorreu durante 30h a 100 rpm. Aproximadamente 3 g/L (massa seca) do inóculo AR foi utilizado na fermentação, o qual foi crescido em meio YEDP (2% em glicose) durante 12h.

3.4. Determinações analíticas

3.4.1. Dosagem de açúcares redutores totais (ART) pelo método do DNS

Na determinação de ART, empregou-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) adaptado de Miller (1959). O reagente DNS foi usado na construção da curva padrão de glicose, a partir de seis soluções padrão de glicose com concentrações conhecidas. De um modo geral, tubos de *Folin-Wü* contendo 1,0 mL de solução de glicose ou amostra diluída e 1,0 mL de DNS foram aquecidos em banho-maria por 5 minutos, e, posteriormente, resfriados em água corrente. O volume da solução foi completado para 12,5 mL com água destilada e homogeneizado. As absorbâncias das soluções/amostras foram lidas em espectrofotômetro *HACH* a 540 nm, zerando o aparelho com o branco (0 mL da solução padrão de glicose).

Os teores de açúcares redutores das amostras foram obtidos por projeção sobre as seguintes curvas padrão: Equações 2 (Ensaio 1 a 4), 3 (Ensaio 5) e 4 (Ensaio 6):

$$\text{ABS (540 nm)} = 0,6769 [\text{ART}] \text{ (g/L)} - 0,0326 \text{ (R}^2 = 0,9901\text{)}, \quad \mathbf{(2)}$$

$$\text{ABS (540 nm)} = 0,6724 [\text{ART}] \text{ (g/L)} - 0,0258 \text{ (R}^2 = 0,9961\text{)}, \quad \mathbf{(3)}$$

$$\text{ABS (540 nm)} = 0,5647 [\text{ART}] (\text{g/L}) - 0,0053 (R^2 = 0,9985), \quad (4)$$

onde ABS é absorvância e [ART] é a concentração de açúcares redutores totais. As equações 3 e 4 foram usadas antes de se obter os resultados cromatográficos de glicose.

3.4.2. Dosagem de células utilizando método turbidimétrico por espectrofotometria

Preparou-se uma suspensão de células crescidas por 24h a 30°C sob agitação de 100 rpm. Após a homogeneização desta suspensão, transferiu-se 5,0 mL para um cadinho previamente seco em estufa a 100°C/24h. Calculou-se a concentração da suspensão celular em termos de g massa seca/L. Prepararam-se diluições da suspensão celular e fizeram-se medidas de turbidez (densidade celular) através da leitura de absorvância destas suspensões diluídas em espectrofotômetro *HACH* a 570 nm contra a água (branco).

A célula comercial crescida em meio YEDP, 2% em glicose (Ensaio 1) resultou na curva padrão da Equação 5.

$$\text{DC (570 nm)} = 1,3948 [\text{MS}] (\text{g/L}) + 0,0075 (R^2 = 0,9985) \quad (5)$$

onde DC é a densidade celular e [MS] é a concentração de massa de células secas (MOREIRA *et al.*, 2013; SUTTON, 2011). Obteve-se a Equação 6 para célula AR crescida em meio YEDP, 2% em glicose (Ensaio 2), meio não adaptado ao meio hidrolisado (Ensaio 3, 5 e 6).

$$\text{DC (570 nm)} = 1,9922 [\text{MS}] (\text{g/L}) + 0,0054 (R^2 = 0,9980) \quad (6)$$

O crescimento da levedura AR pré-adaptada ao meio hidrolisado sem Tween 80 (Ensaio 4) é descrito pela Equação 7.

$$DC (570 \text{ nm}) = 1,6798 [\text{MS}] (\text{g/L}) + 0,0269 (R^2 = 0,9862) \quad (7)$$

3.4.3. Determinação de etanol no mosto pelo método NBR 13920

Utilizaram-se alíquotas de 25 mL de mosto (amostra) para destilação por arraste a vapor em microdestilador *Tecnal* (TE-012) sendo recolhidos 20 mL de destilado. A determinação do teor alcoólico foi realizada pelo método espectrofotométrico do dicromato de potássio (NBR – 13920), da Associação Brasileira de Normas Técnicas (1997).

Na quantificação de etanol, utilizou-se a curva padrão apresentada na Equação 8.

$$ABS (600 \text{ nm}) = 0,2369[\text{etanol}] (\text{g/L}) + 0,0104 (R^2 = 0,9952), \quad (8)$$

onde ABS é absorvância e [etanol] é a concentração de etanol.

Os resultados de absorvância de todos os 20 mL de destilado recolhidos passaram pelo ajuste abaixo, para encontrar o valor de etanol em 25 mL de mosto, considerando que todo este analito foi arrastado durante a destilação.

$$[\text{etanol}]_{\text{mosto}} = 0,8 [\text{etanol}]_{\text{destilado}}$$

O fator 0,8 é a razão do volume de destilado (20 mL) pelo volume da amostra que foi destilada (25 mL).

3.4.4. Quantificações de glicose e etanol por cromatografia líquida (HPLC)

As dosagens de glicose e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) foram realizadas no Laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa – Agroindústria de Alimentos. Utilizou-se cromatógrafo *Waters* com bomba 600, coluna Biorad modelo HPX 87C (300 mm x 7,8 mm) e índice de refração 2014, na temperatura de 80°C. A água Mili-Q foi a fase móvel, empregada na vazão de 0,6 mL/min, para a quantificação dos dois analitos (glicose e etanol). Todas as amostras foram filtradas em membrana com 0,22 µm de diâmetro de poro. Tanto a determinação do etanol quanto da glicose foi feita através da comparação com cromatogramas de cada substância padrão injetada nas condições descritas.

Os dados analíticos de glicose e etanol analisados por HPLC foram utilizados apenas nos ensaios finais de fermentação (Ensaio 5 e 6).

3.5. Cálculos de fermentação

3.5.1. Rendimento

O rendimento do processo de fermentação é dado pela Equação 9. Este parâmetro relaciona o açúcar consumido e o álcool produzido.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (9)$$

onde $Y_{P/S}$: Fator de rendimento do produto (g/g);

P_f : Concentração de produto ao final da reação (g/L);

P_0 : Concentração de produto no início da reação (g/L);

S_f : Concentração de substrato ao final da reação (g/L);

S_0 : Concentração de substrato no início da reação (g/L).

3.5.2. Eficiência de fermentação

Na Equação 10 é dada a eficiência de fermentação, que fornece a percentagem de etanol produzido em relação ao etanol teórico, obtido a partir do valor de glicose (ou ART) consumido multiplicado por 0,511 (rendimento máximo). Portanto, avalia fatores que influenciam a fermentação como os açúcares residuais e a temperatura, de forma indireta.

$$E_F (\%) = \frac{(P_f - P_0) \times 100}{(S_0 - S_f) \times 0,511} \quad (10)$$

onde E_F : Eficiência de fermentação (%);

P_f : Concentração de produto ao final da reação (g/L);

P_0 : Concentração de produto no início da reação (g/L);

S_f : Concentração de substrato ao final da reação (g/L);

S_0 : Concentração de substrato no início da reação (g/L).

Nesta equação, o produto (etanol) e o substrato (glicose ou ART) tem como unidade g/L.

3.5.3. Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica (Equação 11) é um parâmetro de controle da fermentação que, indiretamente, inclui fatores como tempo de fermentação e temperatura.

$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (11)$$

onde Q_p : Taxa de produtividade volumétrica (g/L.h)

P_f : Concentração de produto ao final da reação (g/L);

P_0 : Concentração de produto no início da reação (g/L);

t_f : Tempo de fermentação (h).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Matéria-prima

Os farelos de mandioca usados neste trabalho foram obtidos de safras diferentes e, por este motivo, foram identificados como FM1 e FM2. A caracterização desses farelos está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores médios da caracterização dos farelos de mandioca

Composição	FM1 (%m/v)	FM2 (%m/v)
Amido	59,5	49,3
Umidade	9,72	10,48
Cinzas	1,47	1,82
Proteína (F=5,75)	1,61	1,49
Matéria graxa	0,13	0,19

O teor de umidade dos farelos está de acordo com o observado por Cereda (1996), que relatou um teor médio de 10%. Os valores encontrados para amido, cinzas, proteína e matéria graxa são similares aos obtidos por Saito & Cabello (2006) na análise deste mesmo farelo, com 60,4% de amido, 2,10% de cinzas, 1,59% de proteína (F=6,25) e 0,25 de matéria graxa. O menor teor de amido do FM2 pode ser atribuído à sua maior extração durante a fabricação da fécula de mandioca. O teste F calcula a razão das variâncias (s^2) entre duas amostragens obtidas em condições diferentes, sendo comparada a valores tabelados de constantes F (APARECIDA *et al.*, 2007), conforme tabela acima.

4.2. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca

No ensaio preliminar realizado em pequena escala (1 g de farelo em tubo de ensaio) obteve-se uma eficiência de hidrólise de 78,8% em relação ao

amido após 2,5 horas de processo. Wang, Powell & Oates (1996) relataram taxa de 84,9% de hidrólise em seus experimentos, mas empregando um tempo de hidrólise muito maior (32 horas). Uma vez que se pretendia obter um hidrolisado com cerca de 20% (m/v) de açúcares redutores (ART), a recuperação do amido retido nas fibras do farelo de mandioca através de lavagens não se mostrou adequada, pois produziu um hidrolisado com apenas 2,7% de ART.

A partir desses resultados preliminares foi proposto aumentar a razão sólido:líquido na hidrólise enzimática de 1:27 para 1:4, mantendo-se as demais condições. Neste caso, de 160g de FM extraiu-se aproximadamente 1L de hidrolisado contendo cerca de 130 g/L de ART. Esse resultado pode ser considerado satisfatório, uma vez que no trabalho de Srikanta *et al.* (1987) 150g/L de ART foram encontrados em 75L de hidrolisado proveniente de 75kg de farelo de mandioca. Cereda (2005), no entanto, obteve de 20 a 23°Brix da hidrólise enzimática da mandioca, usando as mesmas enzimas comerciais. Portanto, a concentração de açúcares do meio pode ser aumentada, a partir de um estudo estatístico, a fim de alcançar maiores concentrações de etanol no mosto e observar o comportamento da levedura álcool resistente selecionada.

4.2.1. Planejamento Experimental na Hidrólise Enzimática

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central e a concentração de ART como variável dependente.

Analisando os resultados da Tabela 10, observa-se que, no ensaio 1, os quatro fatores estão no nível mínimo (-1) e a concentração de açúcares é de 165,7 g/L, não sendo este o menor resultado. Os menores teores de açúcares foram obtidos nos ensaios 3, 4, 7 e 11, nos quais o tempo de liquefação (fator B) está no nível máximo (3h). Uma possível explicação para o que foi observado pode estar relacionada à caramelização do açúcar formado na liquefação devido ao longo tempo empregado ou à instabilidade da enzima. De acordo com Spier (2005), a maltose produzida pela ação da α -amilase pode inibir competitivamente a atuação desta enzima em sistema fechado.

Tabela 10 – Matriz do planejamento estatístico para a hidrólise enzimática do FM, tendo como resposta a concentração de açúcares redutores totais (ART)

Ensaio	Concentração de Termamyl		Tempo de liquefação		Concentração de AMG		Tempo de sacarificação		Concentração de ART (g/L)
	A	C _{Termamyl} (mL/g amido)	B	T _{Liquefação} (h)	C	C _{AMG} (mL/g amido)	D	T _{Sacarificação} (h)	
1	-1	0,270	-1	1	-1	0,110	-1	2	165,7
2	1	0,683	-1	1	-1	0,110	-1	2	169,4
3	-1	0,270	1	3	-1	0,110	-1	2	146,0
4	1	0,683	1	3	-1	0,110	-1	2	165,3
5	-1	0,270	-1	1	1	0,517	-1	2	186,5
6	1	0,683	-1	1	1	0,517	-1	2	192,4
7	-1	0,270	1	3	1	0,517	-1	2	156,0
8	1	0,683	1	3	1	0,517	-1	2	182,0
9	-1	0,270	-1	1	-1	0,110	1	4	167,2
10	1	0,683	-1	1	-1	0,110	1	4	183,5
11	-1	0,270	1	3	-1	0,110	1	4	152,7
12	1	0,683	1	3	-1	0,110	1	4	170,1
13	-1	0,270	-1	1	1	0,517	1	4	182,0
14	1	0,683	-1	1	1	0,517	1	4	183,5
15	-1	0,270	1	3	1	0,517	1	4	177,2
16	1	0,683	1	3	1	0,517	1	4	192,1
17	0	0,477	0	2	0	0,313	0	3	179,8
18	0	0,477	0	2	0	0,313	0	3	173,5
19	0	0,477	0	2	0	0,313	0	3	170,1

Verifica-se também que os ensaios 8, 12, 15 e 16 apresentam o fator B no nível superior, mas nestes casos outros dois ou três fatores em nível elevado contribuíram para atenuar o efeito do tempo de liquefação.

Nota-se ainda que as concentrações mais altas de açúcares, ensaios 5, 6, 8, 13, 14 e 16, foram alcançadas quando a concentração de AMG (fator C) era de 0,517 mL/g amido (+1). Segundo Sonogo (2012) na etapa de sacarificação quase todo o amido (85%) é convertido em açúcares fermentescíveis. Embora nos ensaios 7 e 15 a concentração de AMG esteja no nível mais alto, supõe-se que tenha ocorrido a caramelização dos açúcares devido ao maior tempo de liquefação (3h) somado a baixas concentrações de Termamyl (0,270 mL/g amido).

O diagrama de Pareto, contendo todos os termos principais (A, B, C e D) e de interação, está apresentado na Figura 10, onde os efeitos estatisticamente significativos encontram-se à direita da linha vermelha com 95% de confiança ($p < 0,05$). Portanto, o fator mais significativo é a concentração de AMG (fator C), corroborando com a análise dos resultados da matriz do planejamento estatístico.

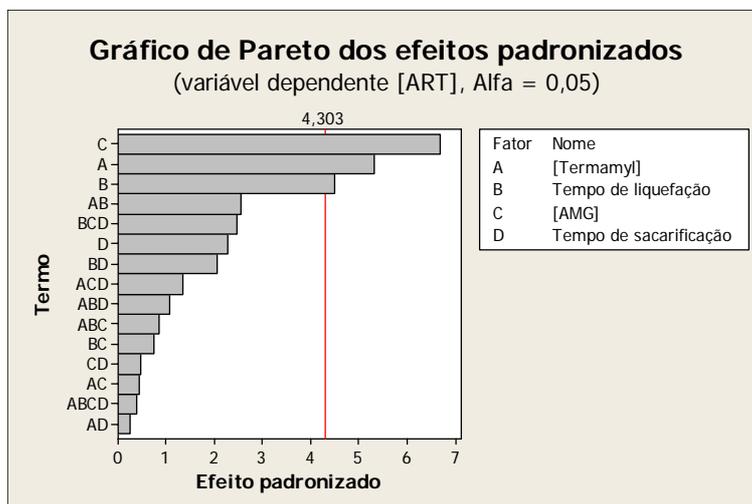


Figura 10 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central mostrando a contribuição dos fatores estudados na concentração de ART.

Observa-se também, que o tempo de sacarificação (fator D) não se mostrou relevante na hidrólise enzimática, podendo estar relacionado ao

pequeno intervalo escolhido (2 a 4h). No estudo de Collares *et al.* (2012) este intervalo chega até às 17h, mas não condiz com a intenção de minimizar os custos energéticos do processo de hidrólise enzimática. Portanto, o menor tempo de sacarificação (2h) foi escolhido.

Foi realizado no Minitab um refinamento estatístico (MATHEWS, 2004) dos resultados do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central, transformando-o num planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central, que forneceu 8 pontos fatoriais e três pontos centrais. Como o fator D foi desprezado, seus 8 ensaios se converteram em duplicata para cada ponto fatorial. Sendo assim, gerou-se uma tabela semelhante à do planejamento anterior, mas sem a coluna do fator D.

Com este refinamento, todos os termos não significativos passaram a ser dados residuais (fator D e os de interação). Deste modo, através do gráfico de probabilidade normal dos resíduos (Figura 11) constatou-se que os erros são homocedásticos, ou seja, possuem variância igual, pois tendem a uma reta normal (reta de 45°). A homocedasticidade elimina a chance de apenas uma gama limitada de variáveis independentes determinar a variância da resposta escolhida (FIGUEIREDO FILHO *et al.*, 2011).

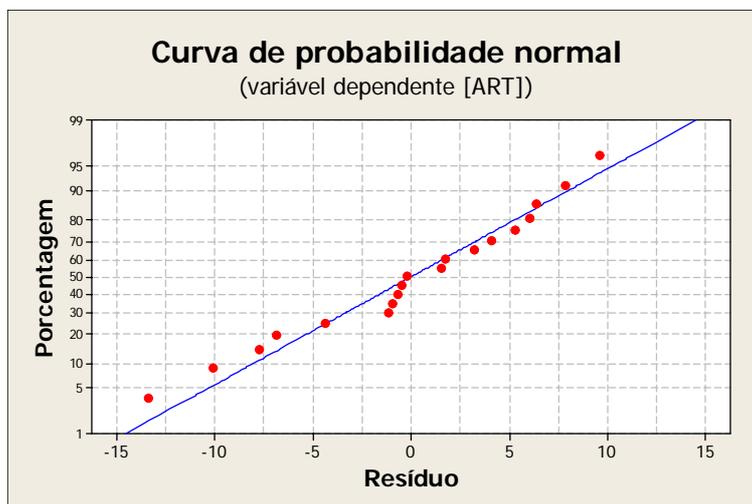


Figura 11 – Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do modelo linear com os termos principais (A, B e C).

A verificação de que os erros tem distribuição normal permite que o modelo refinado seja submetido à análise da variância (ANOVA, do inglês

analysis of variance) visando avaliar a significância do modelo como um todo (Tabela 11).

Tabela 11 – Análise da variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central para a concentração de ART, em valores codificados

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	P
Regressão linear	3	2267,6	755,87	16,08	0,000
Linear	3	2267,6	755,87	16,08	0,000
A: [Termamyl]	1	689,1	689,06	14,66	0,002
B: Tempo de liquefação	1	492,8	492,84	10,48	0,006
C: [AMG]	1	1085,7	1085,70	23,09	0,000
Resíduos	15	705,2	47,01		
Falta de ajuste	5	196,8	39,35	0,77	0,590
Erro puro	10	508,4	50,84		
Total	18	2972,8			

Através da análise da Tabela 11 conclui-se que o modelo linear é significativo ao nível de 5% ($p \leq 0,05$). A Equação 12 descreve este modelo físico-matemático, que relaciona as variáveis influentes do processo com a resposta (concentração de ART) em valores codificados.

$$[\text{ART}] \text{ (g/L)} = 173,421 + 6,563A - 5,550B + 8,237C \quad (12)$$

onde A é a concentração de Termamyl 2X, B é o tempo de liquefação e C é a concentração de AMG.

Os coeficientes de determinação encontrados para este modelo linear são $R^2 = 0,7628$ e $R^2_{\text{ajustado}} = 0,7153$. O coeficiente de determinação múltipla (R^2) indica quanto um modelo fica bem determinado pelos pontos experimentais e o R^2_{ajustado} auxilia na validação do R^2 , pois considera apenas os termos significativos no seu cálculo. Desta forma, se o valor de R^2 está próximo ao do R^2_{ajustado} , admite-se que o ajuste linear do modelo foi adequado e nenhum termo a mais precisa ser descartado.

As superfícies de resposta e as respectivas curvas de nível deste modelo, mostradas na Figura 12, permitem a visualização das regiões de interesse da variação de ART quando os termos A, B e C passam do nível inferior (-1) para o nível superior (1).

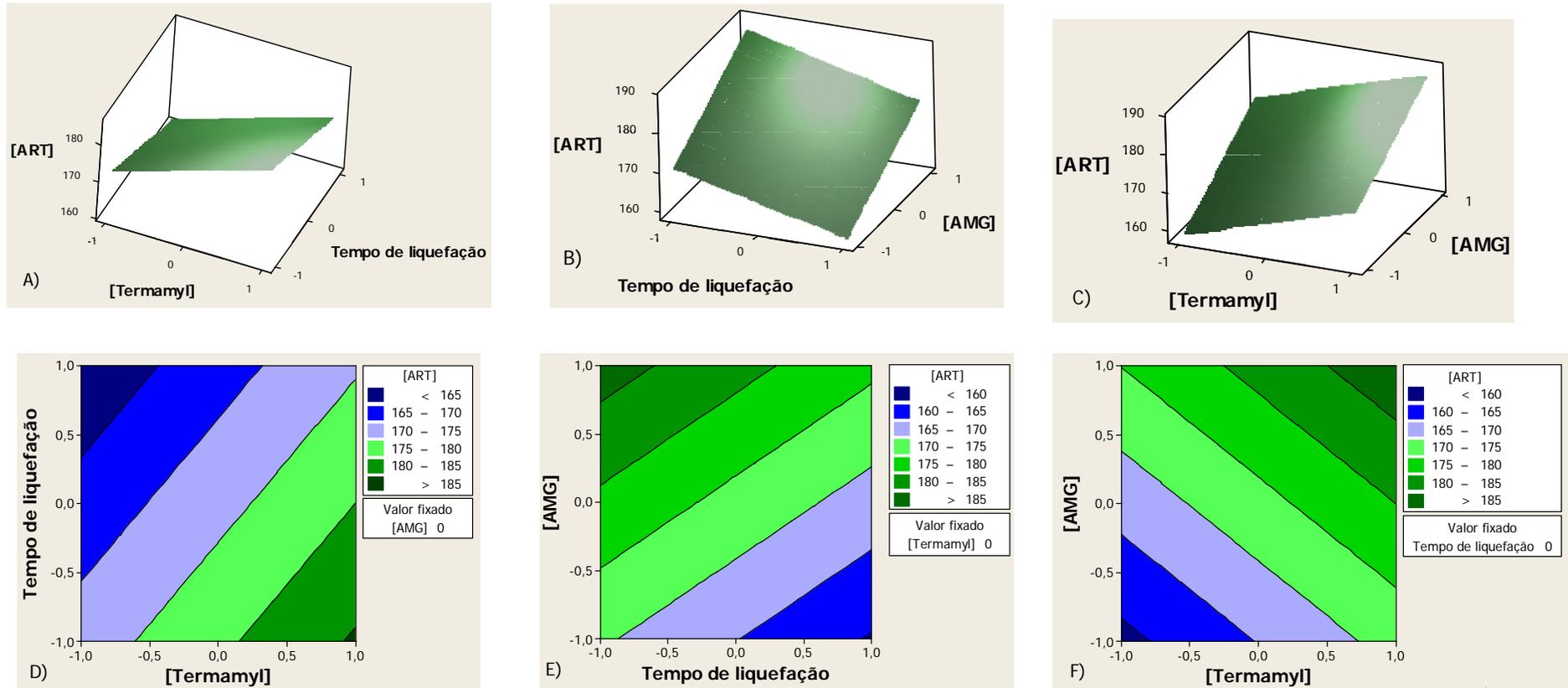


Figura 12 – Superfícies de resposta (A, B e C) e respectivas curvas de nível (D, E e F) do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central sobre hidrólise enzimática, tendo como resposta a concentração de ART.

As superfícies A, B e C da Figura 12 correspondem às curvas de níveis D, E e F, respectivamente. Nas superfícies A e B e nas curvas de níveis D e E verifica-se que existe uma tendência de aumento da concentração de ART quando o tempo de liquefação está no nível mínimo (-1) e as concentrações de Termamyl 2X e AMG 300L estão no máximo. Quando as duas concentrações de enzimas são analisadas (superfície C e curva de nível F), altas concentrações de ART são alcançadas quando estes fatores estão no nível máximo.

Para auxiliar na definição dos níveis (-1, 0 e 1) para cada fator do planejamento utilizou-se a função desejabilidade, de modo a diminuir custos na etapa de hidrólise enzimática feita em sistema estático. Neste sentido, estabeleceu-se como alvo 180 g/L de ART, com variações de 160 a 186,5 g/L, uma vez que as maiores concentrações de ART requerem quantidades mais elevadas das enzimas Termamyl e AMG (Figura 12). Cabe destacar que a desejabilidade é uma técnica de otimização que ajuda a encontrar os valores ou níveis de fatores dentro de faixas desejadas ou otimizadas das respostas (variáveis dependentes). Ela converte cada resposta (y_i) em uma função individual de desejabilidade (d_i) através de métodos de programação não-linear. O valor desejável varia de $0 \leq d_i \leq 1$ e se d estiver próximo de 1, a resposta está dentro da região aceitável (ótima) (SANCHES *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2005).

De acordo com a Figura 13, obteve-se como solução global $y = 180,4$ g/L de ART e $d = 0,93077$ para os fatores A e B no mínimo (-1) e o fator C, no máximo (1).

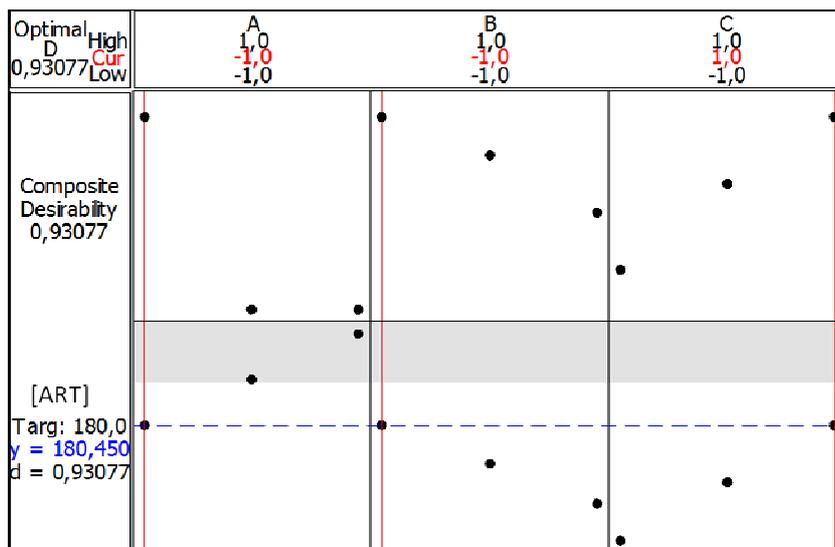


Figura 13 – Otimização através da função desejabilidade para a resposta concentração de ART.

Portanto, a função desejabilidade mostrou que a condição de hidrólise enzimática mais favorável foi a do ensaio 5 (186,5 g/L de açúcares) da Tabela 10, com o fator C (concentração de AMG) no nível máximo (0,517 mL de AMG/g amido) e os demais termos no mínimo (0,270 mL de Termamyl/g amido, 1h de tempo de liquefação), sendo o tempo de sacarificação (termo D) fixado em 2h.

Ao adotar as condições estabelecidas no planejamento para hidrolisar uma maior quantidade de farelo de mandioca (600g de FM) obteve-se 170 g/L de ART, sendo constituído por cerca de 160 g/L de glicose, conforme demonstrado pela análise por HPLC. Segundo Barcelos *et al.* (2011) esta concentração, em torno de 170,0 g/L de ART, é a concentração utilizada industrialmente para produção de etanol.

4.3. Fermentação alcoólica

Os ensaios preliminares de fermentação (Ensaio 1 a 4) apresentam dados de ART e de etanol obtidos, respectivamente, pelos métodos DNS e NBR 13920. Já nos ensaios finais (Ensaio 5 e 6), as determinações de glicose e etanol foram feitas pelo método cromatográfico (HPLC).

4.3.1. Ensaio 1 e 2: Comparação de linhagens em meio YEDP

Os resultados de crescimento celular, concentração de substrato e produção de etanol, para linhagens diferentes de levedura, estão apresentados na Figura 14 e no ANEXO 2.

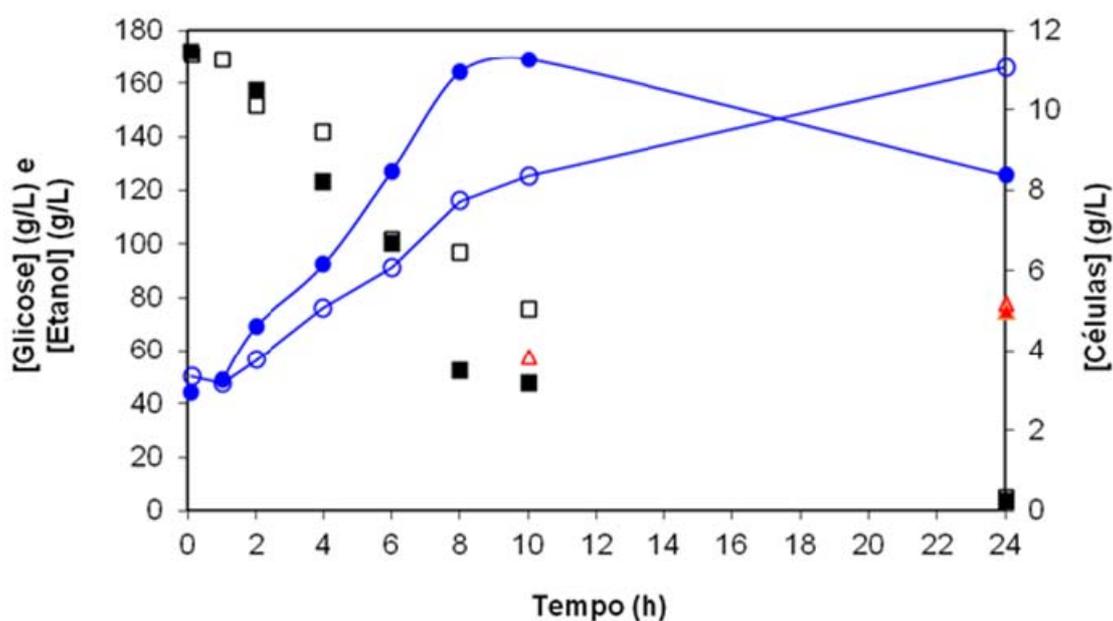


Figura 14 – Fermentação alcoólica em meio YEDP utilizando levedura comercial (E1 com símbolos preenchidos) e *S. cerevisiae* AR (E2 com símbolos abertos). Crescimento celular (●,○), consumo de substrato em termos de glicose (■,□) e produção de etanol (▲,△) em função do tempo de fermentação.

Pode-se observar que o crescimento de ambas as leveduras

apresentaram uma pequena fase de adaptação ao novo meio, podendo estar relacionado ao fato das células terem sido centrifugadas cerca de 16 horas antes do início da fermentação e refrigeradas. Além disso, verifica-se, pelo método turbidimétrico por espectrofotometria, um maior crescimento da linhagem comercial até 10h de fermentação. Entretanto, ao final de 24h, o crescimento da linhagem AR (11,06 g/L) foi 32% superior ao da comercial (8,37 g/L), provavelmente devido à lise celular desta última em meio concentrado de etanol. A ruptura de algumas células comerciais pode fazer com que o espalhamento da suspensão como um todo diminua.

Em relação ao consumo de substrato, por ambas as cepas, notou-se um comportamento praticamente idêntico ao longo tempo, variando de cerca de 170 a 4 g/L. Quanto à produção de etanol, não foram observadas diferenças significativas entre as duas cepas, conforme exposto a seguir. Ao final de 24h de fermentação, obtiveram-se para a levedura AR e comercial, respectivamente, uma produção de etanol de 77,6 g/L e 75,3 g/L, eficiências de fermentação de 87,5% e 91,5% e rendimentos de 0,468 e 0,447. Estas fermentações em meio YEDP com 17% de glicose foram realizadas visando avaliar a eficiência das duas linhagens de leveduras na obtenção de etanol.

Os resultados obtidos indicam que não há diferença relevante entre as duas linhagens, entretanto, pode-se observar uma tendência da levedura AR em manter o seu crescimento até 24h de fermentação, indicando uma resistência ao etanol superior à da linhagem comercial. Por este motivo, a linhagem AR será utilizada nos demais ensaios. Conforme exposto por Baerends *et al.* (2009), a linhagem Hansen BY4741 é tolerante a altas concentrações de açúcares e etanol. Ainda assim, tem sido realizados estudos com o objetivo de aumentar esta tolerância (PARKER *et al.*, 2008; ZHAO & BAI, 2009). Segundo Cavalheiro (2013), esta linhagem pode suportar até 16% de etanol no meio, quando apenas o estresse alcoólico se faz presente.

4.3.2. Ensaios 3 e 4: Inóculo crescido em meio YEDP versus crescido em meio hidrolisado

O crescimento da massa celular, o consumo de açúcares fermentescíveis e a produção de etanol dos Ensaios 3 e 4 (ANEXO 2), usando a levedura AR como inóculo, estão ilustrados na Figura 15. Cabe ressaltar que o meio hidrolisado empregado no Ensaio 4, com 13% de ART após esterilização, foi obtido da hidrólise enzimática anterior ao planejamento experimental.

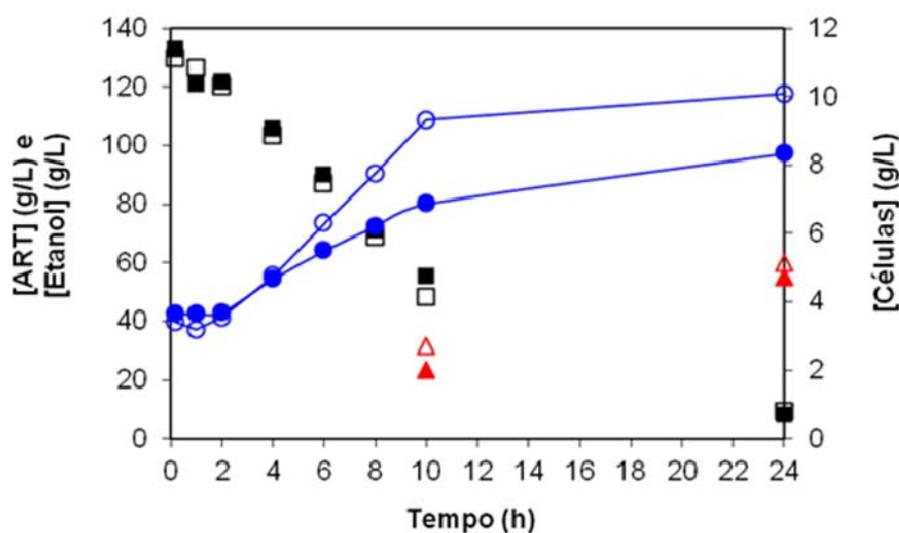


Figura 15 – Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 13% de ART, usando linhagem AR, propagada em meio não adaptado (YEDP 2% em glicose - E3 com símbolos preenchidos) e pré-adaptado (hidrolisado 2% em ART - E4 com símbolos abertos). Crescimento celular (●,○), consumo de substrato em termos de ART (■,□) e produção de etanol (▲,△) em função do tempo de fermentação.

A análise da Figura 15 revela que o consumo do substrato apresentou, ao longo do tempo, comportamento idêntico e decrescente para ambos os ensaios empregando a levedura AR. No entanto, o crescimento celular com a levedura pré-adaptada foi superior a partir das 6h de fermentação, alcançando 10,1 g/L de células ao final de 24h.

O ensaio que utilizou inóculo não adaptado ao meio (Ensaio 3) produziu 54,9 g/L de etanol em 24 horas de fermentação. Neste mesmo tempo, aquele que empregou inóculo pré-adaptado ao meio (Ensaio 4) alcançou 59,8 g/L de álcool. A eficiência de fermentação e o rendimento dos Ensaio 3 e 4 foram, respectivamente, de 86,2% e 96,6%, e 0,440 e 0,493.

Embora a eficiência e o rendimento do Ensaio 4 (inóculo crescido em hidrolisado 2% em ART) sejam superiores ao Ensaio 3 (inóculo crescido em meio YEDP 2% em glicose), a proximidade das concentrações finais de etanol em ambos os ensaios e a facilidade no preparo do meio sintético (YEDP 2% em glicose) levaram à escolha do inóculo crescido em meio não adaptado para a realização dos demais experimentos.

4.3.3. Ensaio 5 e 6: Meio composto por hidrolisado de FM contendo altas concentrações de glicose

Recomenda-se que o meio de fermentação seja inoculado com cultura altamente ativa, ou seja, com inóculo na fase exponencial de crescimento (PACHECO, 2012). Uma análise do crescimento da cepa AR (Figura 16), realizado em meio YEDP (2% em glicose), revela que a fase exponencial varia de 8 a 12h. Portanto, o tempo de crescimento do inóculo adotado nos ensaios finais (Ensaio 5 a 6) foi de 12h em vez de 24h, quando o crescimento já se encontra na fase estacionária.

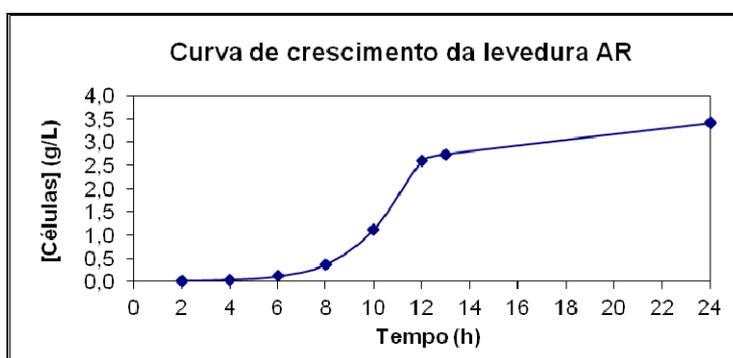


Figura 16 – Curva de crescimento da *S. cerevisiae* AR (Hansen BY4741), em meio YEDP (2% em glicose).

Com o objetivo de simular uma prática corriqueira na indústria (PIMPAKAN, YONGMANITCHAI & LIMTONG, 2012), o caldo hidrolisado não foi esterilizado, ao invés disso, ele foi congelado para evitar contaminações, visto que a fermentação não pode ser realizada ao final da etapa de hidrólise por uma questão de logística. Além disso, evitou-se a intensa gelatinização do amido observada na esterilização.

Os resultados dos ensaios em duplicata (Ensaio 5 e 6) de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol encontram-se apresentados na Figura 17 e no ANEXO 2. O processo fermentativo foi acompanhado durante 30h para avaliar o esgotamento do substrato.

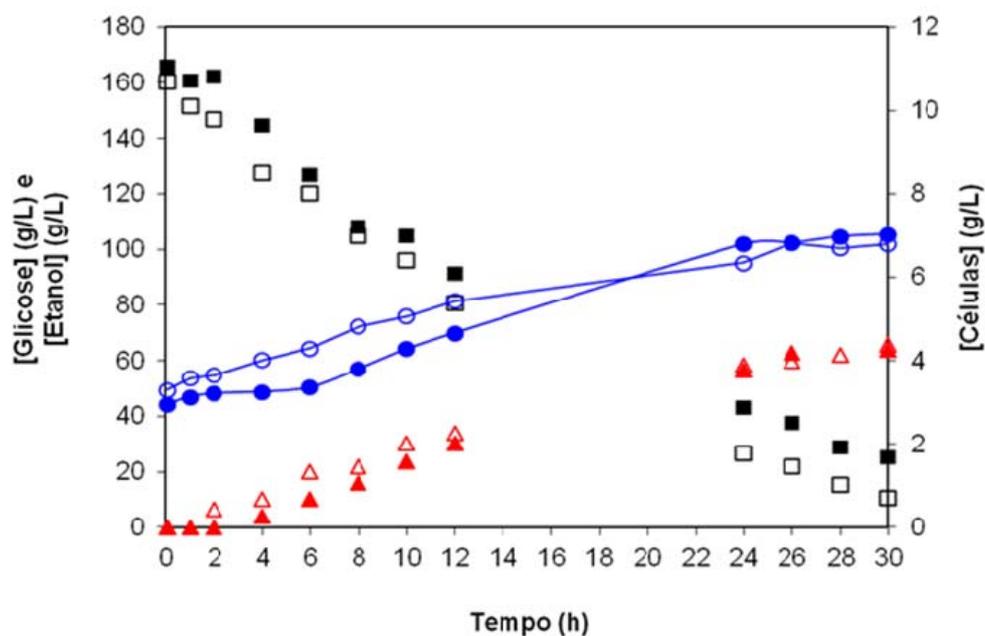


Figura 17 – Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 16% de glicose (E5 com símbolos preenchidos e E6 com símbolos abertos), usando linhagem AR propagada em meio não adaptado (YEDP 2% em glicose). Crescimento celular (●,○), consumo de substrato em termos de glicose (■,□) e produção de etanol (▲,△) em função do tempo de fermentação.

Em relação ao crescimento celular, observa-se uma maior produção de biomassa no Ensaio 6 durante as primeiras 12h, provavelmente devido à indesejada presença de oxigênio dentro do biorreator (AQUILLA, 1997), favorecendo o metabolismo oxidativo.

A Figura 17 mostra ainda que, nas 24h de operação, a glicose do Ensaio 5 não foi totalmente consumida ($S_f=43,1$ g/L) e que a produção de etanol alcançou 56,9 g/L, ou seja, 7,2 % (v/v). Portanto, não foi possível observar a inibição da levedura pelo etanol. Neste sentido, prolongou-se a fermentação até 30h, quando foram quantificados 25,2 g/L de glicose residual e 64,2 g/L de etanol (8,1% v/v). Ou seja, houve um acréscimo de 11% de etanol gerado, indicando que em tempos maiores de processo, uma concentração de cerca de 9% (v/v) de etanol pode ser alcançada, antes do esgotamento do substrato.

No Ensaio 6, após 24h, a concentração residual de glicose foi de 26,8 g/L e a de etanol no mosto foi de 58,6 g/L (7,4% v/v), valores coerentes com os do Ensaio 5, a sua repetição. Aqui, da mesma forma, a não inibição da levedura pelo etanol ao final de 30h de fermentação ($P_f=65,8$ g/L) recomenda observar o comportamento do ensaio por um tempo superior ao empregado, embora, neste caso, haja uma menor quantidade de glicose residual (10,8 g/L). Pode-se inferir que a glicose consumida no Ensaio 6 favoreceu o crescimento celular, devido à entrada de oxigênio, em detrimento da produção alcoólica.

Não obstante, supondo que a inibição da levedura Hansen BY4741 seja verificada apenas acima de 10% (v/v) de álcool, concentrações iniciais de glicose no meio devem ser superiores a 180 g/L e a fermentação deve ser conduzida em, no mínimo, 45h mantendo as condições estabelecidas nos Ensaio 5 e 6. Seguindo esta lógica, a fermentação de hidrolisados de farelo de mandioca usando a *S. cerevisiae* Hansen BY4741 apresenta similaridades com a fermentação do milho, cujo tempo de fermentação varia de 48 a 72h, para fornecer 10-12% de etanol (BAI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008; BOTHAST & SCHLICHER, 2005).

Na Tabela 12 encontram-se as eficiências de fermentação (E_F), os rendimentos ($Y_{P/S}$) e as produtividades volumétricas (Q_P) dos Ensaio 5 e 6 nos tempos de fermentação (t_f) de 24 e 30h.

Tabela 12 – Parâmetros fermentativos dos Ensaio 5 e 6

Parâmetros da fermentação	Ensaio 5	Ensaio 6	Média	Ensaio 5	Ensaio 6	Média
t_f (h)	24			30		
ΔS (g/L)	122,9	133,9	128,4	140,0	149,9	145,0
[Etanol] (g/L)	56,9	58,6	57,8	64,2	65,8	65,0
E_F (%)	90	85,6	87,8	89,3	85,9	87,6
$Y_{P/S}$	0,463	0,438	0,450	0,456	0,439	0,448
Q_P (g/L.h)	2,37	2,44	2,40	2,14	2,19	2,16

Pode-se observar que os Ensaio 5 e 6 apresentaram resultados de produção de etanol e parâmetros fermentativos muito similares, uma vez que foram conduzidos nas mesmas condições.

Para fins de comparação com os resultados da Tabela 12, diversos processos fermentativos empregando condições similares às adotadas nos Ensaio 5 e 6 foram compilados na Tabela 13. Priorizaram-se os meios concentrados em açúcares, as linhagens de *S. cerevisiae* e o processo em batelada. Além disso, estes estudos utilizavam tanto matérias-primas clássicas, ou seja, amiláceas (mandioca, farinha de milho, trigo, batata doce) e açucaradas (cana-de açúcar, beterraba, sorgo açucarado), como também resíduos agroindustriais da mandioca e da batata.

O presente estudo demonstrou valores de parâmetros fermentativos superiores ou próximos aos demais que aparecem na Tabela 13, uma vez que o rendimento foi de 0,45, a eficiência de fermentação de 86-88% e a produtividade de 2,2-2,4, em tempos de 24 e 30h.

Tabela 133 – Comparação com trabalhos da literatura

Trabalho	Matéria-prima - concentração inicial de açúcares (volume utilizado)	Concentração de inóculo inicial	t_f (h)	$Y_{P/S}$	E_f (%)	Q_P (g/L.h)	Observações
Presente estudo	Hidrolisado FM - 16% de glicose (1L)	3 g/L (estimativa: 1,5% v/v) de <i>S. cerevisiae</i> Hansen BY4741	24 e 30	~0,45	86-88	2,4-2,2	<ul style="list-style-type: none"> •Hidrólise enzimática •Batelada em reator a 30°C •65 g/L etanol
Al-Judaibi & Abdulaziz (2011)	Melaço de beterraba tratado com H ₂ SO ₄ - 95 g/L de açúcares	3,6x10 ⁵ células/100 mL de <i>S. cerevisiae</i> CAIMB	24-36	0,379-0,410	74-80	1,16-1,00	<ul style="list-style-type: none"> •17,4-36,3 g/L de etanol •Fermentação a 30°C
Hanh <i>et al.</i> (2011)	Hidrolisado de resíduo de mandioca + melaço de cana - 14,5% de açúcares (1L)	5% (v/v) de <i>S. cerevisiae</i> SC6	60	0,50	98,4	0,96	<ul style="list-style-type: none"> •Hidrólise ácido-enzimática •57,6 g/L etanol •Fermentação a T ambiente
Pavlak <i>et al.</i> (2011)	Hidrolisado de batata-doce diluído com água - 12°Brix (5L)	10 g/L de <i>S. cerevisiae</i> PE-2	36	0,49	97,5	-	<ul style="list-style-type: none"> •Hidrólise enzimática •Batelada a T ambiente
Hashem & Darwish (2010)	Hidrolisado resíduo do processamento da batata - 16% de açúcares (150mL)	1,2x10 ⁶ /mL células de <i>S. cerevisiae</i> y-1646 e comercial	24	-	-	~0,15	<ul style="list-style-type: none"> •Hidrólise ácida •3,61-3,52 g/L de etanol, em condições aeróbicas (30°C)
Nikolic <i>et al.</i> (2010)	Hidrolisado de farinha de milho - 150 g/L de glicose	2% (v/v) de <i>S. cerevisiae ellipsoideus</i>	26	0,35	68,5	1,6	<ul style="list-style-type: none"> •41,6 g/L etanol •Batelada a 30°C
Elena <i>et al.</i> (2009)	Melaço de cana-de-açúcar diluído com água - 180-200 g/L de açúcares (300 mL)	10 ⁸ células viáveis/mL <i>S. cerevisiae</i> Safadistil C-70	36	~0,455	89	2,33	<ul style="list-style-type: none"> •83,88 g/L de etanol •Fermentação a T ambiente
Jorgensen (2009)	Hidrolisado de mistura de trigo enriquecido com licor de milho – 69,2 g/kg de glicose	0,33g/Kg de <i>S. cerevisiae</i> comercial	73	0,49	96	0,8 g/kg.h	<ul style="list-style-type: none"> •Pré-tratamento hidrotérmico + hidrólise enzimática •32,6 g/kg de etanol (32°C)
Laopaiboon <i>et al.</i> (2007)	Suco de sorgo açucarado acrescido de glicose - 24°Brix (350mL)	10 ⁸ /mL células de <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5048	60	0,42	82	1,68	<ul style="list-style-type: none"> •100 g/L de etanol •Batelada a 30°C
Santana (2007)	Hidrolisado de mandioca - 12°Brix (3L)	1L de mosto recebeu 0,4% de <i>S. cerevisiae</i> liofilizado	120	0,44	87	0,41	<ul style="list-style-type: none"> •Hidrólise enzimática usando enzima de cevada •~ 49 g/L de etanol (28°C)

t_f - tempo de fermentação; $Y_{P/S}$ - rendimento; E_f - eficiência de fermentação e Q_P - produtividade volumétrica

A análise da Tabela 13 revela a existência de estudos (HANH *et al.*, 2011; PAVLAK *et al.*, 2011; JORGENSEN, 2009) que apresentaram rendimento, eficiência e tempo de fermentação maiores que os obtidos no presente trabalho, contudo a produtividade foi menor.

Na fermentação de melaço de cana-de-açúcar diluído contendo 18 a 20% de açúcares (ELENA *et al.*, 2009), os parâmetros fermentativos foram praticamente idênticos aos deste estudo. No entanto, a concentração alcoólica foi cerca de 30% maior, provavelmente devido ao inóculo empregado.

Os demais estudos (AL-JUDAIBI & ABDULAZIZ, 2011; HASHEM & DARWISH, 2010; NIKOLIC *et al.*, 2010; LAOPAIBOON *et al.*, 2007; SANTANA, 2007) apresentaram resultados inferiores para os referidos parâmetros, empregando tempos de fermentação similares ou muito superiores.

Portanto, todas estas informações ratificam a viabilidade técnica do processo fermentativo adotado nos Ensaio 5 e 6.

Vale ressaltar, por fim, que durante a destilação do mosto resultante dos Ensaio 5 e 6, observou-se intensa turvação e aumento da viscosidade durante aquecimento dentro do microdestilador, provavelmente, porque o amido residual em solução sofreu o processo de gelatinização e retrogradação (Figura 18).



Figura 18 – Mosto centrifugado não esterilizado antes e depois de aquecimento dentro do microdestilador.

Industrialmente, este fenômeno, que ocorre devido à pequena estabilidade térmica do amido nas proximidades da sua temperatura de gelatinização, pode ser contornado através da destilação sob vácuo. Entretanto, esta tecnologia apresenta um custo muito elevado (MOURA, 2013).

No que tange à viabilidade técnica, o farelo de mandioca mostrou ser um resíduo agroindustrial passível de ser transformado em etanol, embora a

concentração de etanol alcançada nos Ensaio 5 e 6, de 65 g/L, em média, esteja abaixo do valor encontrado em escala industrial (~80 g/L) (BRINGHENTI & CABELLO, 2005).

Apesar de o Brasil possuir potencial para evoluir na produção de mandioca (VILPOUX, 2008), a transformação do farelo de mandioca em insumo para a produção de etanol pode sair cara, devido à necessidade deste material passar por um processo de secagem (SOUZA *et al.*, 2001). Entretanto, em alguns países, este resíduo do processamento da mandioca é secado ao sol por 7-10 dias (HANH *et al.*, 2011).

Adicionalmente, as grandes fecularias com potencial para produzir este resíduo em grande escala, estão concentradas nas regiões centro-sul e sudeste. Este cenário pode favorecer a construção de microdestilarias perto destas fontes de matéria-prima residual, a fim de reduzir seu custo de transporte, seguindo uma tendência verificada no setor sucroalcooleiro (FURBINO, 2013). Já existem pesquisas para incrementar a gama de insumos da microdestilaria, utilizando além da cana, a mandioca, a batata-doce e o sorgo sacarino (CANOVA, 2011).

Portanto, fica patente que o FM apresenta potencial para ser utilizado industrialmente como matéria-prima em processo de hidrólise e fermentação em separado (HFS), conforme desenvolvido neste trabalho, podendo substituir outras fontes amiláceas clássicas, como o milho, o trigo, a mandioca e a batata-doce (Tabela 14)

Tabela 14 – Comparação entre os processos de obtenção de bioetanol de fontes amiláceas no mundo e o material usado neste estudo

FM	Milho	Trigo	Mandioca	Batata-doce
Presente estudo	EUA, Canadá	Europa, Ásia, Canadá	Asia	China

5. CONCLUSÕES

Abaixo, estão enumeradas as conclusões parciais deste trabalho:

1. Os farelos de mandioca utilizados neste estudo apresentaram um teor de amido que variou entre 50 a 60%, podendo o menor teor ser atribuído a uma melhora no processo de extração de amido durante a fabricação da fécula de mandioca.

2. Os ensaios preliminares de hidrólise enzimática mostraram a necessidade de se trabalhar com elevadas relações sólido líquido para obtenção de hidrolisados com altas concentrações de açúcares. A definição das condições ideais de hidrólise foi possível após a realização de um estudo estatístico empregando um planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central que variou as concentrações das enzimas comerciais Termamyl 2X e AMG 300L, com os tempos de liquefação e de sacarificação do farelo de mandioca, respectivamente. O tempo de sacarificação não se mostrou relevante para a hidrólise enzimática no intervalo do estudo (2 a 4h). O fator mais significativo para a hidrólise do farelo de mandioca foi a concentração de AMG.

3. As condições adequadas para a obtenção, em sistema estático, de hidrolisados do farelo de mandioca usando a rota enzimática foram: 0,517 mL de AMG/g amido, 1h de liquefação, 0,270 mL de Termamyl/g amido e 2h de sacarificação. Estas condições resultaram em cerca de 170 g/L de ART no meio hidrolisado, concentração comumente utilizada na indústria alcooleira.

4. As fermentações realizadas em meio YEDP (17% de glicose) com objetivo de avaliar a eficiência de duas linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (comercial e a cepa Hansen BY4741, denominada álcool resistente - AR) indicaram que não há diferença relevante entre elas. Entretanto, observou-se uma tendência da levedura AR em manter o seu crescimento até 24h de fermentação, tendo sido a linhagem escolhida para os demais ensaios.

5. A influência da pré-adaptação da levedura AR, ou seja, do preparo do inóculo em meio de hidrolisado (2% em açúcares), na fermentação do hidrolisado de farelo de mandioca não se mostrou relevante em função da concentração final de etanol obtida. Além disso, a facilidade no preparo do meio sintético (YEDP 2% em glicose) contribuiu para escolha do inóculo

crescido em meio não adaptado para a realização dos experimentos posteriores.

6. Nos ensaios de fermentação com o hidrolisado de farelo de mandioca, a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen BY4741 mostrou ser potencialmente tolerante à concentração de etanol encontrada, de 65 g/L ou 8,2% (v/v), em média, atingida em 30h de fermentação.

7. As condições definidas neste estudo para a fermentação de hidrolisado de farelo de mandioca com elevadas concentrações de açúcares, em reator de bancada de 2L de volume útil, que levaram a altos rendimentos (em média, 0,45) foram:

- meio hidrolisado não esterilizado contendo antiespumante (Tween 80);
- levedura Hansen BY4741
- inóculo crescido durante 12h em meio não adaptado (YEDP, 2% em glicose) e
- fermentação conduzida a 100 rpm, 30°C e pH 5,5.

Diante de tudo o que foi exposto, portanto, pode-se inferir que, após o planejamento experimental, maiores concentrações de açúcares foram obtidas na etapa de hidrólise do FM, sem agitação, ao empregar concentrações mais altas das enzimas α -amilase e glucoamilase, aumentando também o tempo de sacarificação e mantendo o de liquefação, em relação a estudos prévios de hidrólise. Já os últimos ensaios de fermentação apresentaram um aumento da concentração de etanol. Este resultado foi consequência do que foi feito na etapa de propagação do inóculo, uma vez que os parâmetros de fermentação ficaram inalterados. Concomitantemente à diminuição do tempo de crescimento do inóculo, o meio utilizado nessa etapa de propagação era sintético, ou seja, diferente do meio de fermentação, que utilizou o hidrolisado de FM com elevadas concentrações de açúcares. Os parâmetros de fermentação obtidos indicam que o FM serve como matéria-prima para a produção de bioetanol.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir, estão enumeradas algumas sugestões para trabalhos futuros:

1. Mudar as condições de adaptação das células ao meio visando minimizar os tempos de fermentação

2. Fazer um planejamento experimental na etapa de fermentação submersa em biorreator, variando a concentração de inóculo, a velocidade de agitação do reator.

3. Investigar a potência fermentativa de outras leveduras álcool resistente, tais como as industriais Y904, ETHANOL REDTM e PE-2, bem como concentrações de inóculo superiores à utilizada nesse estudo que foi de 3 g/L.

4. Substituir a fermentação submersa por uma fermentação em estado semissólido empregando fungos que produzam alfa-amilases e amiloglicosidases em grandes quantidades, concomitantemente à ação de leveduras álcool resistente.

5. Validar o processo junto ao setor produtivo de farelo de mandioca de forma a avaliar a viabilidade técnica da implementação de uma biorrefinaria/biodestilaria para a produção de bioetanol

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, C. D. **Utilização dos amidos de milho e de batata na elaboração de tapioca**. 2006. 70f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

AL-JUDAIBI, A. A.; ABDULAZIZ, K. Effect of some fermentation parameters on ethanol production from beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* CAIM13. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 301-306, 2011.

ALVES, E. R. A.; VEDOVOTO, G. L.; GAMEIRO, A. H.; BARROS, G.S.C; CARDOSO, C. E. L.; GUIMARAES, V. D. A.; ANTIQUEIRA, T. R. **A indústria do amido de mandioca**. Brasília: Embrapa, 202p. 2003. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento_6.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2013.

APARECIDA, J.; COTTA, O.; SALAMI, F. H.; MARQUES, A. R.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Validação do método para determinação de nitrogênio Kjeldahl total. **Revista Analytica**, v. 26, p. 68-75, 2007.

APLEVICZ, K. S. **Caracterização de produtos panificados à base de féculas de mandioca nativas e modificadas**. 2006. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

AQUILLA, T. The biochemistry of yeast. **Brewing Techniques**, v. 5, n. 2, p. 4, 1997.

ARAÚJO, T. M. **Caracterização Bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. 2013. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13920 - Aguardente de cana: Determinação do teor alcoólico**. Rio de Janeiro, 1997.

BAERENDS, R. J. S.; QIU, J. -L.; RASMUSSEN, S.; NIELSEN, H. B.; BRANDT, A. Impaired uptake and/or utilization of leucine by *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by the SPT15-300 allele of the TATA-binding protein gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6055-61, 2009.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; JAIME, G.; BETANCUR, V.; OLIVEIRA, B. C.; PEREIRA Jr., N. **Avaliação da Hidrólise Enzimática do amido de grãos**

de sorgo (*Sorghum bicolor* L . Moench) e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais...** Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel production - Recent developmens and prospects.** Croatia: InTech, 2011. cap. 5, 85-100.

BATISTOTE, M.; ANDREA, C.; CARDOSO, L.; RAMOS, D. D.; ERNANDES, J. R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. **Ciência e Natura**, v. 32, n. 2, p. 83-95, 2010.

BELLUCO, A. E. S. **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes.** 2001. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba 2001.

BENINCA, C. **Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas.** 2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BERGAMO, A. R.; ANDRES, R.; URIBE, M. **Desenvolvimento e otimização de produção de etanol por processo fermentativo com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em substrato de melaço de cana-de-açúcar.** VII Workshop Agroenergia. **Anais...** Ribeirão Preto: 2013. Disponível em: <http://www.infobibos.com/agroenergia/cd/Resumos/ResumoAgroenergia_2013_012.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2013.

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation: An overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49-70, 2008.

BJÖRCK, I.; GRANFELDT, Y.; TOVAR, J.; ASP, N.-G. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 59, n. 59, p. 699S-705S, 1994.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 19-25, 2005.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia na Agricultura**, v. 20, n. 4, p. 36-52, 2005.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.

ÇAKAR, Z. P.; TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C.; YILMAZ, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, v. 12, p. 171-182, 2012.

CÂMARA SETORIAL DA CADEIA PRODUTIVA DA MANDIOCA E DERIVADOS. **Conjuntura sobre raiz, farinha e fécula de mandioca**, 37p., 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_27_09_38_55_mandioca_e_derivados_junho_2012.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2013.

CAMILI, E. A. **Tratamento da manipueira por processo de flotação sem o uso de agentes químicos**. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2007.

CAMILI, E. A. **Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca**. 2010. 131f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2010.

CAMILI, E. A.; CABELLO, C. **Produção de etanol de manipueira tratada com processo de flotação**. XII Congresso Brasileiro da Mandioca. **Anais...** Paranavaí: Sociedade Brasileira de Mandioca, 2007. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/arquivos/congresso/43Eloneidaaparecidacamili.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012

CANOVA, M. D. **Biocombustíveis: Análise de viabilidade econômica da implantação de microdestilarias de etanol no Rio Grande do Sul**. 2011. 55f. Monografia (Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CARNEIRO, R. L.; SILVA, R. S. S. F.; BORSATO, D.; BONA, E. Métodos de gradiente para otimização simultânea: estudo de casos de sistemas alimentares. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 353-362, 2005.

CAVALHEIRO, A. A. **Análise dos mutantes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria na resistência e produção de etanol**. 2013 78f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Produção de fécula fica estagnada e margem diminui em 2012**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 10p. 2013. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/Cepea_CensoFecula2013.pdf>. Acesso em: 24 out. 2013.

CEREDA, M. P. **Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca**. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, 1996. 56p.

CEREDA, M. P. **Hidrólise enzimática de amido de mandioca para elaboração de álcool**. Paranavaí: ABAM - Associação Brasileira dos

Produtores de Amido de Mandioca, 2005. Disponível em: www.abam.com.br/%2Fmat_tecnicos%2FCeTeAgro%2520-%2520coluna%2520Marney%2520Cereda.doc&ei=OpAWUePoBoim8QSGnYDYCw&usg=AFQjCNGalauOfCHqCxuTQeFJ7_XC-q3jKQ&bvm=bv.42080656,d.eWU. Acesso em: 03 fev. 2012.

CHICHERCHIO, C. L. S. Mandioca e principais derivados. In: **Estudos de prospecção de mercado: Safra 2012/2013**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2012. 148p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_11_16_41_03_prospeccao_12_13.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2013.

COLLARES, R. M. **Otimização do processo de hidrólise da mandioca “in natura”, com o uso de enzimas amilolíticas e pectinolítica**. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

COLLARES, R. M.; MIKLASEVICIUS, L. V. S.; BASSACO, M. M.; SALAU, N. P. G.; MAZUTTI, M. A.; BISOGNIN, D. A.; TERRA, L. M. Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. **Journal of Zhejiang University. Science. B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 13, n. 7, p. 579-586, jul. 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Mandioca – raiz, farinha e fécula: período de 17 a 21/12/2012**. Brasília: Conab. 2012. 3p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_26_14_17_38_mandioca17a21122012.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2013.

DEMIATE, I. M.; KOTOVICZ, V. Cassava starch in the Brazilian food industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 388-397, 2011.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DE VRIES, S. C.; VAN DE VEN, G. W.J.; VAN ITTERSUM, M. K.; GILLER, K. E. Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 588-601, 2010.

DINIZ, D. S. **Produção de álcool etílico utilizando como matérias primas resíduos florestais e agrícolas**. 2008. 231f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

ELENA, P.; GABRIELA, R.; CAMELIA, B.; TRAIAN, H. Bioethanol production from molasses by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI, Food Technology**, p. 49-56, 2009.

ELEUTHERIO, E. C. A.; ARAUJO, P. S.; PANEK, A. D. Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cryobiology**, v. 30, p. 591-596, 1993.

EMBRAPA: MANDIOCA E FRUTICULTURA. **Produção internacional de mandioca**. 2013. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/0000001356-Mandioca_Mundo_2011.pdf>. Acesso em: 22 set. 2013. Acesso em 14 nov. 2013.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.

EXPERT GROUP ON ENERGY EFFICIENCY. **Realizing the potential of energy efficiency: Targets, policies, and measures for G8 countries**. Washington: United Nations Foundation, 72p. 2007. Disponível em: <http://www.globalproblems-globalsolutions-files.org/unf_website/PDF/realizing_potential_energy_efficiency.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2013.

FELIPE, F. I.; ALVES, L. R. A.; VIEIRA, R. M. Produção na Tailândia versus Brasil. **Agroanalysis**, 1p., 2013.

FIGUEIREDO FILHO, D.; NUNES, F.; ROCHA, E. C.; SANTOS, M. L.; BATISTA, M.; SILVA Jr., J. A. O que fazer e o que não fazer com a regressão: Pressupostos e aplicações do modelo linear de mínimos quadrados ordinários (MQO). **Revista Política Hoje**, v. 20, n. 1, p. 44-99, 2011.

FURBINO, Z. **Produção brasileira é concentrada em grandes usinas, mas pequenas avançam no interior**. 2013 Disponível em: <http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2013/10/27/internas_economia,464201/producao-brasileira-e-concentrada-em-grandes-usinas-mas-pequenas-avancam-no-interior.shtml>. Acesso em: 11 nov. 2013.

GAEWCHINGDUANG, S.; PENGTHEMKEERATI, P. Enhancing efficiency for reducing sugar from cassava bagasse by pretreatment. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 46, p. 727-730, 2010.

GOMES, A. M. M.; SILVA, C. E. M.; SILVA, P. L.; RICARDO, N. M. P. S.; GALLÃO, M. I. Annealing of unfermented (polvilho doce) and fermented (polvilho azedo) cassava starches. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 223-232, 2010.

GONÇALVES, R. S.; BATTISTIN, A.; FERMINO, M. H.; SILVEIRA, J. R. P. **Produção de etanol a partir da hidrólise ácida do amido da mandioca**. Simpósio Estadual de Agroenergia 1a Reunião Técnica Anual de Pesquisa de Agroenergia. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/Agroenergia_2007/Agroener/trabalhos/Tecnologias_11_OK/Goncalves_1.pdf>. Acesso em: 11 mai. 2013.

GRANCO, G.; ALVES, L. R. A.; FELIPE, F. I. **Descrição de alguns entraves na comercialização de farinha de mandioca no Brasil**. XI Congresso Brasileiro de Mandioca. **Anais...** Campo Grande: 2005. Disponível em: <http://www.cpao.embrapa.br/11cbm/_html/trabalhos/arquivoPDF/pasta24.PDF>. Acesso em: 25 mar. 2013.

GROXKO, M. **Aspectos econômicos da mandioca**. 2011, 14p. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/mandiocultura_2011_12.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2013.

_____. **Mandiocultura: Análise da conjuntura agropecuária**. 2012, 15p. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandiocultura_2012_13.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2013.

HANH, V. T.; THI, L.; PHUONG, B.; PHONG, T. T.; HUNG, L. T.; HUONG, L. T. **Using wet cassava waste for ethanol production**. 8th Biomass-Asia Workshop. **Anais...** Hanoi: 2011. Disponível em: <<http://www.biomass-asia-workshop.jp/biomassws/08workshop/abstract.html>>. Acesso em: 26 nov. 2013.

HASHEM, M.; DARWISH, S. M. I. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 953-959, 2010.

HORIMOTO, L. K.; CABELLO, C. Propriedades viscográficas de amidos de mandioca, batata doce e mandioquinha salsa nativos e cationizados por diferentes tratamentos. **Revista Energia na Agricultura**, v. 22, n. 3, p. 74-85, 2007.

IBETO, C. N.; OFOEFULE, A. U.; AGBO, K. E. A global overview of biomass potentials for bioethanol production: A renewable alternative fuel. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 6, n. 5, p. 410-425, 2011.

INSTITUTO EUVALDO LODI - NÚCLEO CENTRAL. **Álcool combustível**. Brasília: IEL/NC (Série Indústria em Perspectiva), 2008. 163p.

JORGENSEN, H. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 44-57, 2009.

KONGKIATTIKAJORN, J. Production of amylase from *Saccharomyces diastaticus* sp. and hydrolysis of cassava pulps for alcohol production. **Journal of Agricultural Science and Technology B**, v. 2, p. 909-918, 2012.

KUIPER, L.; EKMEKCI, B.; HAMELINCK, C.; HETTINGA, W.; MEYER, S.; KOOP, K. **Bio-ethanol from cassava**. Utrecht: Ecofys Netherlands BV, 38p., 2007.

LAOPAIBOON, L.; THANONKEO, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1497-1501, 6 abr. 2007.

LATORRE-GARCÍA, L.; ADAM, A. C.; MANZANARES, P.; POLAINA, J. Improving the amylolytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* glucoamylase by the addition of a starch binding domain. **Journal of Biotechnology**, v. 118, n. 2, p. 167-76, 4 ago. 2005.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Melhoria do rendimento de hidrólise enzimática para produção de etanol a partir de farelo de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1,2, p. 111-118, 1999.

_____. Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 1-13, 2000a.

_____. Extração da fécula retida no resíduo fibroso do processo de produção de fécula de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2000b.

_____. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; ROAU, X. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte de fibras dietéticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 10, 1999.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M. P. Processo industrial de fécula de mandioca e batata doce - um estudo de caso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 1-6, 1998.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. *In*: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W. (Eds.). **Biotechnologia Industrial**. 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 593.

LUCENA, B. A.; GRANDO, R. L.; BARCELOS, C. A.; ALHADEFF, E.; PEREIRA Jr., N. **Otimização da hidrólise enzimática de resíduo de arroz para a produção de etanol**. IXVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais...** Caxias do Sul: 2011.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. E. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Revista de Política Agrícola**, v. Ano XV, n. 3, p. 64-78, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1160.

MARX, S.; NQUMA, T. Y. Cassava as feedstock for ethanol production in South Africa. **African Journal of Biothechnology**, v. 12, n. 31, p. 4975-4983, 2013.

MATHEWS, P. G. **Design of experiments with MINITAB: Homework problems**. [s.l.]: ASQ Quality Press, 2004. 59p.

MCKEE, T.; MCKEE, J. Carbohydrate metabolism. *In*: **Biochemistry: The molecular basis of life**. 5th. ed. New York: Oxford University Press, 2011. 43p.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C.; HUBELE, N. F. **Estatística aplicada à engenharia**. 2^a ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2004. 352p.

MOREIRA, B. L. D.; PARAZZI, C.; PAPIN, L. F.; LOPES, J. J. C. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* alcoólica. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1672-1677, 2013.

MORESCO, D. A. **Aproveitamento do resíduo sólido resultante do processamento de fécula de mandioca na elaboração de barra alimentícia**. 2009. 79f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2009.

MOURA, A. G. **As últimas tecnologias da destilação**. Revista Opiniões-*on line*. 2013. Disponível em: <<http://www.revistaopinioes.com.br/aa/materia.php?id=1189>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e avaliação de amido nativo e modificado de pinhão mediante provas funcionais e térmicas**. 2009. 156f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

NEVE, V. J. M.; BROETTO, F.; MARCHESI, J. A. Aproveitamento do resíduo da produção de farinha de mandioca na produção de álcool fino. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 4, p. 14-21, 2008.

NIGAM, P. S. NEE'; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. 466p.

NIKOLIC, S.; MOJOVIC, L.; PEJIN, D.; RAKIN, M.; VUKASINOVIC, M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1449-1456, 2010.

OLIVEIRA, E. M. M.; MATOS, A.; PENHA, E. M.; NORONHA, F. B. **Uso de resíduos de mandioca para a produção de etanol**. I Simpósio sobre Inovação e Criatividade Científica na Embrapa. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2008. Disponível em: <http://www.embrapa.br/eventos/inovaecria/comunicacoes/101_etanolresiduosmandioca_ednaoliveira_ctaa_0822_1753.pdf>

_____. **Quando a mandioca entrar na bomba de combustível**. Grupo Cultivar-*on line*, 2009 Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=875>>. Acesso em: 11 fev. 2013.

OLIVEIRA, K. R. F. **Processos ecotecnológicos no tratamento de efluentes líquidos de fecularia**. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.

PACHECO, T. F. Tecnologia industrial. In: MAY, A.; DURAES, F. O. M.; PEREIRA FILHO, I. A.; SCHAFFERT, R. E.; PARRELLA, R. A. C. (Ed.). **Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol: Sistema BRS1G-Tecnologia Qualidade Embrapa**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. p. 92-106.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000.

PARKER, J. E.; MERKAMM, M.; MANNING, N. J.; POMPON, D.; KELLY, S. L.; KELLY, D. E. Differential azole antifungal efficacies contrasted using a *Saccharomyces cerevisiae* strain humanized for sterol 14 alpha-demethylase at the homologous locus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3597-603, 2008.

PAVLAK, M. C. M.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C.; PAULILLO, S. C. L. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p.82-86, 2011.

PIMPAKAN, P.; YONGMANITCHAI, W.; LIMTONG, S. Bioethanol production from sugar cane syrup by thermo-tolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042, using fed-batch and repeated-batch fermentation in a nonsterile system. **Kasetsart Journal: Natural Science**, v. 46, p. 582-591, 2012.

PAVLAK, M. C. M.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C.; PAULILLO, S. C. L. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 82-86, 2011.

PURBA, E. Comparison of hydrolisis of cassava starch (*Manihot Esculenta*) and sweet potato starch (*Ipomoea Batatas*) with cold process using enzyme acid-fungal amylase and glucoamylase. **International Journal of Science Engineering and Technology**, v. 2, n. 2, p. 7-11, 2009.

RAY, R. C.; MOHAPATRA, S.; PANDA, S.; KAR, S. Solid substrate fermentation of cassava fibrous residue for production of alpha-amylase, latic acid and ethanol. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 1, p. 111-115, 2008.

RESENDE, M. M.; OLIVEIRA, R. H. A. **Avaliação da preparação da casca de mandioca para utilização em um processo de obtenção de aguardente**. VII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica. **Anais...** Uberlândia, MG: 2009. Disponível em: <<http://www.cobeqic2009.feq.ufu.br/uploads/media/89722331.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2013.

ROBERTSON, G. H.; WONG, D. W. S.; LEE, C. C.; WAGSCHAL, K.; SMITH, M. R.; ORTS, W. J. Native or raw starch digestion: A key step in energy efficient

biorefining of grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 353-365, 2006.

SADEGHI, A.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S. A.; MAHALATI, M. N. Evaluation of different parameters effect on maltodextrin production by α -amylase Termamyl 2-x. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, n. 1, p. 34-39, 2008.

SAITO, I. M.; CABELLO, C. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Energia na Agricultura**, v. 21, n. 3, p. 34-44, 2006.

SANCHES, A. L.; MARINS, F. A. S.; MONTEVECHI, J. A. B.; RIBEIRO, D. A. **Dimensionamento de Kanban estatístico por DOE simulado**. IV Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia. **Anais...** Resende: Associação Educacional Dom Bosco, 2007. Disponível em: <http://www.aedb.br/seget/artigos07/425_425_DOESimuladoKanban-SegetSubmitted.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2013.

SANTANA, N. B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SANTOS, R. C.; BORTOLLI, M. C. A.; NOGUEIRA, T. C.; PENHA, E. M.; OLIVEIRA, E. M. M.; MATOS, A.; SA, L. R.; FERREIRA-LEITAO, V. S. F. **Conversão enzimática de resíduos da agroindústria de mandioca para a produção de etanol**. II Semana de Biotecnologia Industrial. **Anais...** Lorena: 2010.

SANTOS, R. S. **Sacarificação enzimática do resíduo da extração de óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para a produção de bioetanol**. Relatório Final de Iniciação Científica. Diamantina: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 20p., 2010.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 73, p. 129-69, 2001.

SEBRAE. **Manual de referência para casa de farinha**. Maceió: Sebrae Alagoas, 2006.

SEBRAE BAHIA. **Mandiocultura: Derivados da mandioca**. Salvador: Integra Consultoria e Representação e Comércio, 40p., 2009.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Mandiocultura: Fécula e farinha**. 78p., 2008. Disponível em:

<[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/F2D4D65FFFA3B380832574DC0046BFE1/\\$File/NT00039086.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/F2D4D65FFFA3B380832574DC0046BFE1/$File/NT00039086.pdf)>. Acesso em: 24 abr. 2013.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SOBRINHO, P. **Processo (simplificado) de produção de etanol de milho**. Cuiabá: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), 8p., 2012.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus***. Curitiba, 1994, p.280. (Tese de Professor Titular. UFPR).

SONEGO, J. L. S. **Efeitos da aplicação do resíduo da produção de etanol de batata sobre diferentes culturas**. 2012. 69f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SOUZA, A. F. B. C. E. **Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] por meio de células imobilizadas para produção de etanol**. 2005. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Ambiente), Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2005.

SOUZA, T. S. C.; FIORDA, F. A.; MOURA, C. M.; SOARES Jr., M. S. **Propriedades funcionais tecnológicas de farinhas pré-gelatinizadas de bagaço e fécula de mandioca**. 63^a Reunião Anual da SBPC - XIX Seminário de Iniciação Científica da UFG – PIVIC. **Anais...** Goiânia: 2001.

SPENCER, F. T.; SPENCER, D. M. Genetic improvement of industrial yeasts. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 121-142, 1983.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. M. **Yeasts in natural and artificial habitats**. Berlin: Springer, 1997. p. 381

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SRICHUWONG, S.; GUTESA, J.; BLANCO, M.; DUVICK, S. A.; GARDNER, C.; JANE, J.-L. Characterization of corn grains for dry-grind ethanol production. **Journal of ASTM International**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2010.

SRIKANTA, S.; JALEEL, S. A.; GHILDYAL, N. P.; LONSANE, B. K.; KARANTH, N. G. Novel Technique for saccharification of cassava fibrous waste for alcohol production. **Starch/Stärke**, v. 39, p. 234-237, 1987.

SRIROTH, K.; PIYACHOMKWAN, K.; WANLAPATIT, S.; OATES, C. G. Cassava starch technology: the Thai experience. **Starch/Stärke**, v. 52, p. 439-449, 2000.

SRIROTH, K. PIYACHOMKWAN, K.; WANLAPATIT, S.; NIVITCHANYONG, S. The promise of a technology revolution in cassava bioethanol: From Thai practice to the world practice. **Fuel**, v. 89, p. 1333-1338, 2010.

SRIROTH, K.; WANLAPATIT, S.; PIYACHOMKWAN, K. Cassava Bioethanol. In: LIMA, M. A. P.; NATALENSE, A. P. P. (Eds.). **Bioethanol**. Croatia: InTech, 2012. p. 290.

SUMAN, P. A.; URBANO, L. H.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, p. 379-384, 2011.

SUTTON, S. Measurement of microbial cells by optical density. **Journal of Validation Technology**, v. 17, n. 1, p. 46-49, 2011.

TORRES, L. M. **Caracterização dos parâmetros técnicos do processo de fabricação de aguardente a partir de gengibre**. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 894.

UCLA. **Cassava**. Mildred E. Mathias Botanical Garden-*on line*, 2011. Disponível em: <http://www.botgard.ucla.edu/html/botanytextbooks/economic_botany/Manihot/>. Acesso em: 11 set. 2012.

VALLE, T. L.; FELTRAN, J. C.; CARVALHO, C. R. L. **Mandioca para a produção de etanol**. Material técnico. Campinas: ABAM - Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, 16p., 2008. Disponível em: <http://www.abam.com.br/mat_tecnicos/mandioca.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2013.

VANDEPUTTE, G. E.; DERYCKE, V.; GEEROMS, J.; DELCOUR, J. A. Rice starches. II. Structural aspects provide insight into swelling and pasting properties. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 1, p. 53-59, 2003.

VAN DER VEEN, M. E.; VEELAERT, S.; VAN DER GOOT, A. J.; BOOM, R. M. Starch hydrolysis under low water conditions: A conceptual process design. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 178-186, 2006.

VILPOUX, O. F. Competitividade da mandioca no Brasil, como matéria-prima para amido. **Informações Econômicas**, v. 38, n. 11, p. 27-38, 2008.

WANG, W. J.; POWELL, A. D.; OATES, C. G. Sago starch as a biomass source: raw sago starch hydrolysis commercial enzymes. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 55-61, 1996.

YINGLING, B.; ZONGCHENG, Y.; HONGLIN, W.; LI, C. Optimization of bioethanol production during simultaneous saccharification and fermentation in very high-gravity cassava mash. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 329-339, 2011.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BON, E. P.; GIORDANO, R. C.; MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; CARVALHO NETO, C. C.; MACEDO, I. C.; FO, D. L.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 23-30, 2009.

ANEXO 1 – Matéria-prima, biorreator e microdestilador

Figura 19 – Biorreator *Biostat A Plus* da *Sartorius* em operação.



Figura 20 – Microdestilador *Tecna* TE-012 em operação.

ANEXO 2 – Dados de fermentação: concentrações de açúcares, células e etanol para os Ensaios de 1 a 6

Tabela 15 – Fermentação alcoólica em meio YEDP utilizando levedura comercial (E1) e *S. cerevisiae* AR (E2)

Tempo (h)	Ensaio 1 (E1)			Ensaio 2 (E2)		
	[Glicose] (g/L)	[Células] (g/L)	[Etanol] (g/L)	[Glicose] (g/L)	[Células] (g/L)	[Etanol] (g/L)
0,08	171,8	2,95	-	-	-	-
0,10	-	-	-	170,7	3,35	-
1	-	3,26	-	168,8	3,17	-
2	157,4	4,62	-	151,5	3,77	-
4	123,2	6,15	-	141,7	5,08	-
6	100,1	8,48	-	101,6	6,07	-
8	52,3	10,95	-	97,0	7,73	-
10	47,7	11,27	-	75,7	8,35	57,7
24	3,4	8,37	75,3	4,8	11,06	77,6

Tabela 16 - Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 13% de ART, usando linhagem AR, propagada em meio não adaptado - YEDP 2% em glicose (E3) e pré-adaptado - hidrolisado 2% em ART (E4)

Tempo (h)	Ensaio 3 (E3)			Ensaio 4 (E4)		
	[ART] (g/L)	[Células] (g/L)	[Etanol] (g/L)	[ART] (g/L)	[Células] (g/L)	[Etanol] (g/L)
0,17	132,8	3,64	-	130,0	3,41	-
1	121,0	3,65	-	126,6	3,18	-
2	121,5	3,70	-	120,1	3,53	-
4	105,5	4,66	-	103,3	4,76	-
6	90,0	5,49	-	87,0	6,30	-
8	70,8	6,21	-	68,7	7,74	-
10	55,1	6,87	23,2	48,2	9,31	31,3
24	8,1	8,35	54,9	9,0	10,08	59,8

Tabela 17 - Fermentação alcoólica em meio hidrolisado de FM contendo 16% de glicose (E5 e E6), usando linhagem AR propagada em meio não adaptado (YEDP 2% em glicose).

Tempo (h)	Ensaio 5 (E5)			Ensaio 6 (E6)		
	[Glicose] (g/L)	[Células] (g/L)	[Etanol] (g/L)	[Glicose] (g/L)	[Células] (g/L)	[Etanol] (g/L)
0,08	166,0	2,96	0	160,7	3,30	0
1	160,9	3,13	0	151,5	3,58	-
2	162,1	3,21	0,1	146,9	3,65	6,8
4	144,7	3,25	4,2	127,5	4,02	10,5
6	126,8	3,36	10,3	120,3	4,30	20,0
8	108,2	3,80	16,0	104,8	4,82	22,1
10	104,9	4,28	23,9	96,0	5,06	30,3
12	91,4	4,66	30,4	81,0	5,44	34,2
24	43,1	6,79	56,9	26,8	6,34	58,6
26	37,7	6,82	63,0	22,0	6,83	60,0
28	28,8	6,97	-	15,6	6,70	62,0
30	25,2	7,03	64,2	10,8	6,80	65,8

ANEXO 3 – Trabalhos publicados em 2013

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL AMILÁCEO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

I. H. VALERIANO¹, T. AZEREDO¹, E. M. PENHA^{1,2}, M. M. M. GONÇALVES¹

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química

² Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Processos Fermentativos

E-mail para contato: marciamg@uerj.br

RESUMO – O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a etapa de hidrólise enzimática do farelo de mandioca visando a obtenção de altas concentrações de açúcares. O estudo foi conduzido empregando-se um planejamento fatorial completo (2^4), com replicata no ponto central, para investigar a influência dos seguintes fatores na hidrólise enzimática: concentração de α -amilase, tempo de liquefação, concentração de glucoamilase e o tempo sacarificação. A condição de hidrólise mais favorável foi a do ensaio com a concentração de glucoamilase no nível máximo do planejamento (0,517 mL de AMG/g amido) e os demais termos no mínimo (0,270 mL de Termamyl/g amido, 1h de tempo de liquefação e 2h de tempo de sacarificação), quando foram gerados 186,5 g/L de açúcares.

1. INTRODUÇÃO

O farelo de mandioca (FM), resíduo da fabricação da farinha de mandioca, contém em média 75% de amido, sendo normalmente destinado às indústrias de ração. No entanto, pode-se agregar valor a esta matéria-prima amilácea ao utilizá-la na produção de bioetanol (Leonel e Cereda, 2000).

De um modo geral, a transformação do amido em etanol pode passar pelas seguintes etapas: (1) hidrólise enzimática, para a conversão do amido em açúcares e (2) fermentação alcoólica, que transforma o açúcar em etanol. Sendo assim, a etapa de hidrólise mostra-se determinante para obtenção dos açúcares fermentescíveis visando à produção do bioetanol. Geralmente, este processo é realizado em duas fases: liquefação empregando α -amilases e sacarificação utilizando glucoamilases sob agitação (Suman *et al.*, 2011).

Diante do exposto, visando a obter altas concentrações de açúcares e, paralelamente, diminuir custos e tempo reacional, realizou-se um planejamento experimental fatorial completo (2^4) com replicata no ponto central para investigar a influência dos seguintes fatores na hidrólise enzimática do FM: concentração de α -amilase (Termamyl 2X), tempo de liquefação, concentração de glucoamilase (AMG 300L) e o tempo sacarificação (Montgomery *et al.*, 2004).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O farelo de mandioca empregado neste estudo foi fornecido pela *Halotek-Fadel Industrial Ltda* (Palmital/SP), sendo o teor de amido determinado através do método de

hidrólise ácida adaptado de Cereda *et al.* (2004). As enzimas comerciais usadas foram Termamyl 2X e AMG 300L, ambas doadas pela *Novozymes*.

Os valores empregados no planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central estão apresentados na Tabela 1. Neste planejamento empregou-se um sistema estático numa razão sólido:líquido de 1:3, sem controle de pH. A análise estatística dos ensaios foi feita no programa *Minitab® 16*, com 95% de confiança.

Tabela 1 – Valores reais e codificados de planejamento fatorial aplicado à hidrólise

Fator Nível	1ª etapa - Liquefação		2ª etapa - Sacarificação	
	A: [Termamyl] (mL/g amido)	B: Tempo de liquefação (h)	C: [AMG] (mL/g amido)	D: Tempo de sacarificação (h)
-1	0,270	1	0,110	2
0	0,477	2	0,313	3
1	0,683	3	0,517	4

Os ensaios de hidrólise foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 30g de FM. Os frascos foram aquecidos a 120°C por 15 minutos visando melhorar a disponibilidade das macromoléculas do amido (amilopectina e amilose) para o ataque enzimático (Santos *et al.*, 2006). Na etapa de liquefação, o FM previamente tratado foi misturado a uma solução enzimática de Termamyl 2X (0,270-0,683 mL/g amido) e permaneceu a 100°C durante 1-3h. Em seguida, este material foi aclimatado a 60°C e sacarificado com uma solução enzimática de AMG 300L (0,110-0,517 mL/g amido) por 2-4h. Por último, a concentração de açúcares do filtrado foi quantificada pelo método do ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O FM utilizado continha 59,5% de amido, valor menor (76,6 %) que o encontrado por Leonel e Cereda (2000), provavelmente devido a uma maior extração do amido durante a fabricação da farinha de mandioca.

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento cujo resultado é dado em termos de concentração de açúcares redutores totais (variável dependente). Analisando os resultados, observa-se que no ensaio 1, no qual todos os quatro fatores estão no nível mínimo (-1), a concentração de açúcares é de 165,7 g/L, não sendo este o menor resultado. Os menores teores de açúcares foram obtidos nos ensaios 3, 4, 7 e 11, nos quais o tempo de liquefação (fator B) está no nível máximo (3 h.). Uma possível explicação para o que foi observado pode estar relacionada à caramelização do açúcar formado na liquefação devido ao longo tempo empregado ou à instabilidade da enzima. Verifica-se também que ensaios 8, 12, 15 e 16 apresentam o fator B no nível superior, mas nestes casos outros dois ou três fatores em nível elevado contribuíram para atenuar este efeito. Nota-se ainda que as concentrações mais altas de açúcares, ensaios 5, 6, 8, 10, 13, 14 e 16, foram alcançadas quando a concentração de AMG (fator C) era de 0,517 mL/g amido (+1). Segundo Sonogo (2012), na etapa de sacarificação 85% do amido é convertido em açúcares fermentescíveis. Embora nos ensaios 7 e 15 a concentração de AMG esteja no nível mais alto, supõe-se que tenha ocorrido a

caramelização dos açúcares devido ao maior tempo de liquefação (3 h.) somado a baixas concentrações de Termamyl (0,270 mL/g amido).

Tabela 2 – Matriz do planejamento estatístico para a hidrólise enzimática do FM, tendo como resposta a concentração de açúcares redutores totais (ART)

Ensaio	Concentração de Termamyl		Tempo de liquefação		Concentração de AMG		Tempo de sacarificação		Concentração de ART (g/L)
	A	C _{Termamyl} (mL/g amido)	B	T _{Liquefação} (h)	C	C _{AMG} (mL/g amido)	D	T _{Sacarificação} (h)	
1	-1	0,270	-1	1	-1	0,110	-1	2	165,7
2	1	0,683	-1	1	-1	0,110	-1	2	169,4
3	-1	0,270	1	3	-1	0,110	-1	2	146,0
4	1	0,683	1	3	-1	0,110	-1	2	165,3
5	-1	0,270	-1	1	1	0,517	-1	2	186,5
6	1	0,683	-1	1	1	0,517	-1	2	192,4
7	-1	0,270	1	3	1	0,517	-1	2	156,0
8	1	0,683	1	3	1	0,517	-1	2	182,0
9	-1	0,270	-1	1	-1	0,110	1	4	167,2
10	1	0,683	-1	1	-1	0,110	1	4	183,5
11	-1	0,270	1	3	-1	0,110	1	4	152,7
12	1	0,683	1	3	-1	0,110	1	4	170,1
13	-1	0,270	-1	1	1	0,517	1	4	182,0
14	1	0,683	-1	1	1	0,517	1	4	183,5
15	-1	0,270	1	3	1	0,517	1	4	177,2
16	1	0,683	1	3	1	0,517	1	4	192,1
17	0	0,477	0	2	0	0,313	0	3	179,8
18	0	0,477	0	2	0	0,313	0	3	173,5
19	0	0,477	0	2	0	0,313	0	3	170,1

No diagrama de Pareto apresentado na Figura 1, onde os efeitos significativamente importantes encontram-se à direita da linha vermelha, é possível notar que o fator mais significativo é a concentração de AMG (fator C), corroborando a análise dos resultados da Tabela 1. Observa-se também, que o tempo de sacarificação (fator D) não se mostrou relevante na hidrólise enzimática, podendo estar relacionado ao pequeno intervalo escolhido (2 a 4 h.) (Collares *et al.*, 2012).

Visto que o fator C é o mais significativo do planejamento estatístico, a condição de hidrólise mais favorável foi a do ensaio 5 (186,5 g/L de açúcares), ou seja, a concentração de AMG está no máximo (0,517 mL de AMG/g amido) e os demais termos estão no mínimo (0,270 mL de Termamyl/g amido, 1h de tempo de liquefação e 2h de tempo de sacarificação).

4. CONCLUSÃO

Elevadas concentrações de açúcares foram obtidas no processo de hidrólise enzimática do amido presente no farelo de mandioca, empregando altas cargas de AMG na etapa de sacarificação. Além disso, visando diminuir custos e o tempo reacional, concluiu-se que o

ensaio com AMG no máximo e os demais termos no mínimo leva a obtenção de um hidrolisado adequado produção de bioetanol.

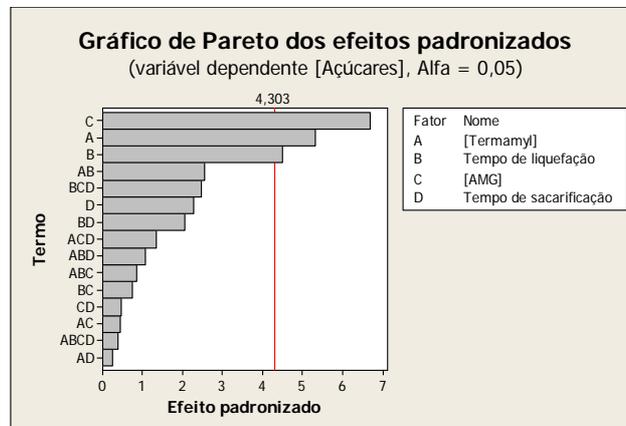


Figura 1 – Diagrama de Pareto mostrando a contribuição dos fatores estudados na concentração de açúcares.

5. REFERÊNCIAS

- CEREDA, M. P.; DAIUTO, E. R.; VILPOUX, O. Metodologia de determinação de amido: digestão ácida em micro-ondas. *ABAM*, v. 2, n. 8, p. 3, 2004.
- COLLARES, R. M.; MIKLASEVICIUS, L. V. S.; BASSACO, M. M.; SALAU, MAZUTTI, M. A.; N. P. G.; BISOGNIN, D. A.; TERRA, L. M. Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. *J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed. & Biotechnol.)*, v.13, n. 7, p. 579-586, 2012.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 20, n. 2, p. 1-13, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C.; HUBELE, N. F. Estatística aplicada à engenharia. 2ª ed.; LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.: Rio de Janeiro, p. 352, 2004.
- SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. *Janus*, v. 3, n. 4, p. 165-183, 2006.
- SONEGO, J. L. S. Efeitos da aplicação do resíduo da produção de etanol de batata sobre diferentes culturas. Santa Maria, 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- SUMAN, P. A.; URBANO, L. H.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). *Acta. Sci. Technol.*, v. 33, n. 4, p. 379–384, 2011.

PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS ÁLCOOL RESISTENTE A PARTIR DE HIDROLISADOS DE FARELO DE MANDIOCA

I. H. VALERIANO¹, S. JOSEF¹, M. M. M. GONÇALVES¹, E. M. PENHA^{1,2}

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química

² Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Processos Fermentativos

E-mail para contato: marciamg@uerj.br

RESUMO – Foi realizada a fermentação alcoólica de um hidrolisado de farelo de mandioca com elevado teor de açúcares redutores totais (186,5 g/L), obtido por tratamento enzimático com α -amilase e glucoamilase comerciais. Após ser fortificado, 1 litro do hidrolisado foi fermentado em reator *Biostat A Plus* (*Sartorius*) de 3L, em regime de batelada, a 30°C, pH 5,5 e 100 rpm. Como inóculo foram utilizados cerca de 3 g/L (massa seca) de uma linhagem de levedura potencialmente álcool tolerante, *Saccharomyces cerevisiae* AR, crescida por 12h em meio YEDP com 2 % de glicose. A concentração máxima de etanol obtida foi de 71,5 g/L em 30 horas de fermentação, com uma eficiência de fermentação de 99 %. Os resultados mostraram-se promissores e indicaram possível tolerância da linhagem utilizada ao álcool, embora, no tempo de processo estudado, não tenha ocorrido o total esgotamento do substrato. Cabe destacar que foi observada uma considerável fase *lag* de seis horas que sugere a necessidade de adaptação da levedura ao hidrolisado muito concentrado em açúcares.

1. INTRODUÇÃO

O custo do bioetanol frente à gasolina sofre grandes oscilações ao longo do ano devido, em parte, à sazonalidade da cana-de-açúcar, principal matéria-prima utilizada no Brasil para a produção deste combustível. O uso de fontes alternativas a esta biomassa açucarada pode ajudar a estabilizar o seu preço, como milho (fonte amilácea) e palha de cana (fonte celulósica) (Sobrinho, 2012).

Em tempos de desenvolvimento sustentável, busca-se aproveitar os resíduos da agroindústria brasileira para produzir etanol, pois estes são ricos em polissacarídeos não diretamente fermentescíveis, abundantes, com baixo valor comercial e chegam a ser considerados um problema ambiental (Bringhenti *et al.*, 2007). Uma das possibilidades é o farelo de mandioca, resíduo sólido gerado na produção de fécula (amido) e farinha de mandioca, que contém em média 75% de amido e 11,5 % de fibras. Estudos mostram que este amido, previamente hidrolisado, pode ser fermentado por leveduras do gênero *Saccharomyces* (Leonel e Cereda, 2000).

Neste trabalho, objetiva-se avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático de farelo de mandioca com uma linhagem de *S. cerevisiae* modificada geneticamente para ser álcool resistente (AR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Material

O farelo de mandioca empregado neste estudo foi fornecido pela *Halotek-Fadel Industrial Ltda* (Palmital/SP), sendo o teor de amido determinado através do método de hidrólise ácida adaptado de Cereda *et al.* (2004). As enzimas comerciais usadas foram Termamyl 2X e AMG 300L, ambas doadas pela *Novozymes*. Os ensaios foram conduzidos com uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* álcool resistente (Hansen BY4741).

1.2. Métodos

A hidrólise enzimática do farelo de mandioca foi realizada nas seguintes condições: concentração de α -amilase de 0,270 mL de Termamyl/g amido, tempo de liquefação de 1h, concentração de glucoamilase de 0,517 mL de AMG/g amido e tempo sacarificação de 2h. Estas condições foram estabelecidas num estudo prévio que visava à obtenção de hidrolisado com altas concentrações de açúcares. O hidrolisado foi filtrado e a concentração de açúcares quantificada pelo método do DNS (ácido dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Um litro de hidrolisado foi fortificado com extrato de levedura (1%) e peptona de carne (1%), além da adição de um antiespumante (Tween 80) na concentração de 0,05%. A fermentação ocorreu no biorreator *Biostat A Plus* (*Sartorius*) de 3L, em regime de batelada, a 30°C, 100 rpm e pH 5,5, controlado com adição, quando necessária, de NaOH 2M ou H₂SO₄ 1M, de acordo com esquema da Figura 1.



Figura 1 – Esquema da fermentação alcoólica e da destilação do mosto.

A concentração do inóculo foi cerca de 3 g/L (massa seca) de *S. cerevisiae* AR, crescida por 12h em meio YEDP com 2 % de glicose, em agitador de bancada (*Tecnal* modelo TE-420) a 100 rpm e 30°C. Foram coletadas 12 amostras de mosto fermentado num período de 30 horas para a determinação de células (espectrofotometria associada ao peso seco) e glicose

(método do DNS). As amostras para a determinação de etanol (10h, 24h e 30h) foram resfriadas e centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, sendo utilizada uma alíquota de 25,0 mL do sobrenadante na destilação por arraste a vapor em microdestilador *Tecnal* TE-012. Em seguida, o teor alcoólico do destilado foi determinado pelo método do dicromato de potássio, segundo a NBR 13920 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O farelo de mandioca empregado neste estudo contém 59,5 % de amido, sendo que o hidrolisado deste farelo contém uma concentração de açúcares redutores de 178,3 g/L, que segundo Barcelos *et al.* (2011) está próxima à concentração utilizada industrialmente para produção de etanol. A fim de simular uma prática corriqueira na indústria, o caldo hidrolisado não foi esterilizado, ao invés disso, ele foi congelado para evitar contaminações, visto que a fermentação não poderia ser realizada em seguida. Desta forma, evitou-se a intensa gelatinização do amido na etapa de esterilização.

Os resultados de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol encontram-se apresentados na Figura 2. A figura mostra também uma extensa fase *lag* (6h) no crescimento celular, que pode estar associada à elevada concentração inicial de açúcar no meio de fermentação.

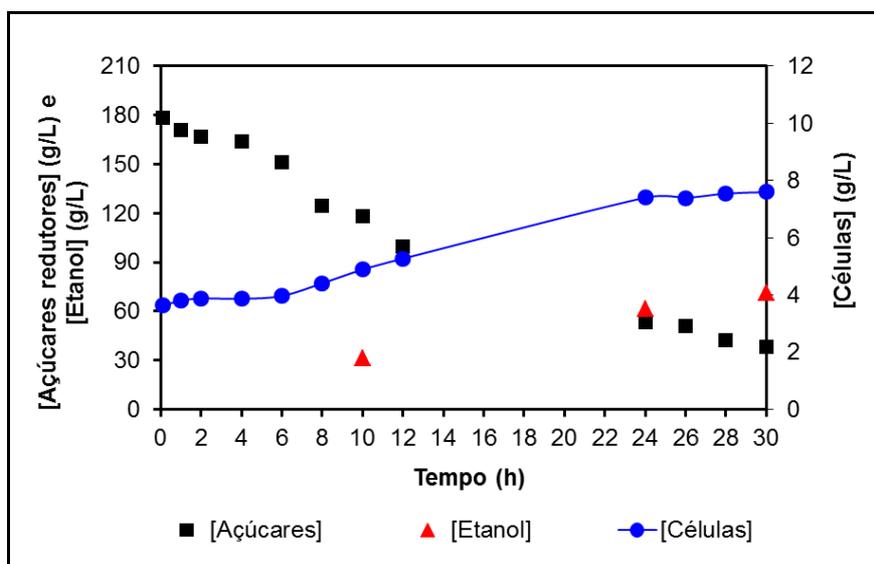


Figura 2 – Perfil cinético de crescimento celular, produção de etanol e consumo de substrato com concentração inicial de açúcares de 178,3 g/L, empregando a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* AR (Hansen BY4741).

A figura mostra ainda que, nas 30h de operação, os açúcares não foram totalmente consumidos e que a produção de etanol atingiu 71,4 g/L, que corresponde a 9,1 % (v/v). Pode-se observar que não foi percebida inibição da levedura pela concentração de álcool atingida em 30h de fermentação e que a eficiência de fermentação foi próxima a 99 %. A não inibição da produção de etanol ao final do experimento recomenda observar o comportamento do processo por um tempo superior ao empregado, quando seria possível evidenciar a evolução

da produção de etanol e, conseqüentemente, a tolerância da levedura a maiores teores alcoólicos.

4. CONCLUSÃO

A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* AR utilizada neste experimento mostrou boa tolerância à máxima concentração de etanol (71,4g/L) atingida em 30 horas de fermentação. Esta cepa pode ser considerada, portanto, potencialmente álcool resistente, uma vez que ao final do processo ainda havia açúcares residuais que, por sua vez, poderiam ser convertidos em maiores teores de etanol.

5. REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13920: Aguardente de cana - Determinação do teor alcoólico. Rio de Janeiro, 1997.
- BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; BETANCUR, G. J. V.; OLIVEIRA, B. C.; PEREIRA Jr., N. Avaliação da hidrólise enzimática do amido de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.
- BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melaço de cana. *Ciênc. agrotec.*, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.
- CEREDA, M. P.; DAIUTO, E. R.; VILPOUX, O. Metodologia de determinação de amido: digestão ácida em microondas. *ABAM*, v. 2, n. 8, p.1-3, 2004.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 20, n. 2, p. 1-13, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- SOBRINHO, P. Processo (simplificado) de produção de etanol de milho. – Boletim técnico da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Cuiabá, 2012, 8 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_28_12_11_19_007a-12_-_proc_simplificado_-_prod_etanol_-_milho-_mt.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2013.