

NÍVIO BATISTA SANTANA

**EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE DE AMIDO DE MANDIOCA POR
DIFERENTES FONTES DE ENZIMAS E RENDIMENTO DA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

NÍVIO BATISTA SANTANA

**EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE DE AMIDO DE MANDIOCA POR
DIFERENTES FONTES DE ENZIMAS E RENDIMENTO DA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de outubro de 2007.

Profª. Mônica Ribeiro Pirozi
(Co-orientadora)

Pesq. Virgínia Maria Chaves Alves
(Co-orientadora)

Prof. José Antonio Marques
Pereira

Prof. José Benício Paes Chaves

Prof. Paulo Henrique Alves da Silva
(Orientador)

A Deus,
À minha família,
À minha namorada,
Aos meus amigos e colegas,
A todos aqueles que fazem parte da minha vida e dessa vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, dono de toda a ciência e sabedoria. “O temor do Senhor é o principio da sabedoria.” Provérbios 9:10.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Paulo Henrique Alves da Silva pela orientação, atenção e apoio em todos os momentos deste curso.

Às professoras Mônica Pirozi, Virgínia Alves, Maria Goreti Almeida pelos oportunos conselhos e sugestões.

Aos meus pais, Hélio Mafra de Santana e Raquel Batista da Silva, pelo amor, educação e incentivo em todas as áreas da minha vida.

A minha irmã Valéria, pelo amor dedicado.

A minha namorada Quésia pelo amor, compreensão, apoio, paciência, incentivo demonstrados durante estes anos.

Aos meus amigos de república, Vagner, Rosana, Andréia e Ivan, pelos momentos vividos juntos durante este período.

A Ludmila Beghini pela amizade e ajuda durante o experimento.

Ao amigo e colega Alexandre Fontes pela amizade, companheirismo e ajuda.

Aos colegas da pós-graduação do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Aos amigos, mais chegados que irmãos, da Primeira Igreja Batista de Viçosa e da Aliança Bíblica Universitária - Grupo Pós Graduação, pelo amor, amizade, força e pelas orações.

Aos amigos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela amizade que perdura até hoje.

BIOGRAFIA

Nívio Batista Santana, filho de Hélio Mafra de Santana e Raquel Batista da Silva, nasceu em Itapetinga, Bahia, no dia 09 de Junho de 1981.

Em Julho de 2005 graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Juvino Oliveira, em Itapetinga, Bahia.

Em Agosto de 2005, ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A história do Álcool no Brasil	4
2.2 Mandioca com matéria-prima para a produção de etanol.....	7
2.3 Hidrólise de amido	8
2.4 Custos de produção do álcool	9
2.5 Processos de obtenção do etanol.....	11
2.6 Matérias-primas para obtenção de etanol.....	11
2.7 Mandioca.....	14
2.7.1 Aspectos gerais da planta.....	14
2.7.2 Utilização da mandioca no Brasil.....	15
2.3 Amido	17
2.4 Enzimas.....	20
2.4.1 Definição.....	20
2.4.2 Enzimas Amilolíticas	21
2.5 Malte	28
2.5.1 Produção do malte.....	28
2.7 Composição do álcool	39
3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AMIDO DE MANDIOCA E DOS MALTES DE CEREAIS.....	41
3.1 Introdução.....	41
3.2 Materiais e Métodos.....	42
3.4 Resultados e Discussão	47
3.5 Conclusão.....	51
4. HIDRÓLISE DO AMIDO DE MANDIOCA PELAS ENZIMAS DOS MALTES DE CEVADA, TRIGO, MILHO E CENTEIO EM TRÊS CONCENTRAÇÕES....	52
4.1 Introdução.....	52
4.2 Materiais e Métodos.....	54
4.3 Delineamento experimental	55
4.4 Resultados e Discussão	56
4.5 Conclusão.....	64
5. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DOS MOSTOS OBTIDOS DO AMIDO DE MANDIOCA HIDROLISADO PELAS ENZIMAS DOS MALTES.....	66

5.1 Introdução.....	66
5.2 Materiais e Métodos.....	67
5.2.3 Procedimento experimental das fermentações.....	70
5.3 Delineamento experimental	72
5.4 Resultados e Discussão	73
5.4.4 Balanço de massa da produção álcool de mandioca.....	83
5.5 Conclusão.....	88
6 CONCLUSÃO GERAL	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

RESUMO

SANTANA, Nívio Batista. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2007. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol.** Orientador: Paulo Henrique Alves da Silva. Co-orientadores: Mônica Ribeiro Pirozi e Virginia Maria Chaves Alves.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de álcool por dois tipos de leveduras a partir de amido de mandioca, utilizando maltes de cereais como fonte de enzimas amilolíticas. O trabalho se dividiu em duas etapas. Na primeira, foram feitos ensaios para se determinar a melhor concentração de malte a ser utilizado na hidrólise. As concentrações testadas foram, 4, 8 e 12,5% de malte em relação à massa de amido. Foram testados os maltes de cevada, trigo, milho e centeio com objetivo de se determinar se algum destes seria o mais adequado para utilização neste tipo de processo. Os hidrolisados foram analisados com relação ao perfil dos açúcares formados e foi calculado o rendimento da hidrólise, com o objetivo de se determinar qual o melhor tipo e concentração de malte. Estes ensaios foram feitos em suspensões de 100g contendo 12% de fécula de mandioca que foi gelatinizado, em seguida resfriado até 50°C submetido à ação das enzimas do malte por 24h na temperatura de 50°C. Foram feitas análises de regressões para se ajustar modelos que descrevessem o perfil da hidrólise. Os maltes utilizados foram analisados com relação ao teor de amido, açúcares, umidade, pH e atividade amilolítica. A fécula de mandioca utilizada foi caracterizada com relação ao teor de amido, umidade e pH. Na segunda etapa, de posse dos resultados da primeira, foram feitas fermentações dos mostos hidrolisados. A concentração de malte utilizada foi de 12,5% para todos os tipos de cereal. O malte de cevada atingiu maiores valores de rendimento e apresentou maior atividade enzimática, juntamente com o trigo.

Entretanto, apesar da menor atividade amilolítica, o malte de milho apresentou rendimentos próximos aos do malte de cevada quando usado na maior concentração. Foram preparadas suspensões de 1kg, contendo 12% de amido de mandioca que foram gelatinizadas, hidrolisadas com o malte e inoculadas com a levedura. Foram utilizadas neste processo as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, que é a levedura tradicionalmente utilizada para a produção de álcool e *Saccharomyces diastaticus*, que é uma variedade que apresenta a característica de produzir a enzima glicoamilase e crescer utilizando substrato amiláceo. As leveduras foram inoculadas e o processo fermentativo foi monitorado através do consumo de substrato, geração de produto, queda do pH e elevação da acidez do mosto. Não houve interação significativa entre os fatores malte e levedura. As maiores concentrações de etanol foram encontradas nos mostos fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* e variaram entre 39,1 e 48,9 g de etanol/L. Apesar de apresentar menores concentrações de etanol, os mostos fermentados por *Saccharomyces diastaticus* apresentaram elevada hidrólise do amido, variando entre 99,2% e 97,9% o que indica elevada capacidade desta levedura em hidrolisar o amido. A composição do produto formado foi analisada por meio de cromatografia gasosa. Foi observado que a formação de acetaldeído foi mais intensa nos mosto de cevada e centeio fermentados por *S. cerevisiae*. Acetato de etila esteve mais presente nos mostos fermentados de centeio e cevada e não houve variação entre as duas leveduras para este composto. Metanol foi encontrado em maiores proporções nos mostos fermentados por *S.cerevisiae*, enquanto que os mostos fermentados por *S. diastaticus* apresentaram maiores teores de 1 propanol. Os valores para álcool isobutilico e isoamilico não variaram entre os tratamentos testados. Os dados obtidos servem de base para outras pesquisas, visando o aperfeiçoamento deste processo. A busca por fontes de enzimas mais baratas e processos mais aperfeiçoados que diminuam os custos de energia são pontos fundamentais para viabilizar a produção de etanol a partir de material amiláceo.

ABSTRACT

SANTANA, Nívio Batista. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2007. **Efficiency of cassava starch hydrolysis by different sources of enzymes and alcoholic-fermentation yield for ethanol production.** Adviser: Paulo Henrique Alves da Silva. Co-Advisers: Mônica Ribeiro Pirozi and Virginia Maria Chaves Alves.

The objective of this work was to evaluate the alcohol production of two yeast strains from cassava starch, using cereal malts as source of amilolytic enzymes. The work was divided in two steps. In the first step, assays were carried out to determinate the best malt concentrations would be used on the hydrolysis. Four concentrations of malt in relation to starch mass, 4,0; 8,0 and 12,5% were tested, Barley, wheat, corn and rye malts were tested aiming to set if any of them of they would be most suitable for usage in this kind of process. Hidrolysed suspensions were analyzed regarding to formed sugars profile by enzymatic kits and the hydrolysis yield was calculated to determinate the best malt concentration. These tests were conducted in suspensions of 100g containing 12% of cassava starch, which was jellied and cooled until 50°C and, then, submitted to malts' enzymes action for 24h at 50°C. Regressions analyses were done in order to find models that describe better the hydrolysis profile. The malts used were analyzed in relation to starch rates, sugars, moisture content, pH and amilolytic activity. The cassava starch used was characterized in relation to starch, moisture content and pH. In the second step, with the results of the first one, fermentations of the wort were done. The malt concentration used was 12,5% for all cereals. Barley malt has reached greater yield values and presented greater amilolytic activity as well as wheat. However, despite of the smaller amilolytic activity, corn malt have shown yields close to barley malt when used in the highest concentration. 1Kg suspensions containing

12% of cassava starch were jellied, hydrolyzed with malt and inoculated with the yeast. In this process were used *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain, traditionally used for alcohol production and *Saccharomyces diastaticus* yeast strain, which presents glycoamilase enzyme production and the growth using starch as substratum. Yeast were inoculated and the fermentative process was monitored by substratum consumption, product generation, pH decreasing and wort acidity increase. The largest alcohol concentrations were found in the *S. cerevisiae*-fermented worts and varied from 39,1 to 48,98 g of ethanol L⁻¹. In spite of presenting smaller ethanol concentrations, the *S. diastaticus* fermented worts presented higher starch consumption, varying from 99,21 to 97,92%, indicating an high capacity of starch consumption by this yeast. Formed products compositions were analyzed by gas chromatography. It was observed that acetaldehyde formation was more intense in barley and rye wort fermented by *S. cerevisiae*. Ethyl acetate was more present in barley and rye fermented wort and there was not difference between these two yeasts for this compound. Methanol was found in greater proportions in *S. cerevisiae*-fermented worts, while *S. diastaticus*-fermented worts presented more concentrations of 1 propanol. Isobutyl and isoamyl alcohols values didn't vary among the tested treatments. The obtained data serve as basis for other researches, looking for this process improvement. The search for cheaper enzyme sources and process with higher incomes that diminish the energy costs are fundamental points to make possible the ethanol production from starch material.

1. INTRODUÇÃO

A produção de álcool a partir de mandioca apresenta algumas dificuldades técnicas e econômicas. A necessidade de hidrólise do amido gera elevação dos custos aliada à baixa produtividade agrícola não tornam esse processo viável economicamente. Diante disso, o estudo de melhorias no processo tecnológico de produção e melhorias agrônômicas da cultura são pontos cruciais para utilização desta cultura como fonte de carboidratos para produção de etanol.

A busca por fontes limpas e renováveis de energia tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias alternativas aos processos convencionais. Os biocombustíveis têm demonstrado um grande potencial para a substituição em escala maior dos derivados do petróleo. Existem diversas fontes disponíveis para a produção destes novos tipos de combustíveis, e como se tratam de fontes vegetais, pode-se garantir a continuidade da produção e com isto evitar uma eventual crise de abastecimento energético. Cana-de-açúcar, milho, beterraba, oleaginosas como a soja, mamona, dendê, além de biomassa vegetal como celulose, hemicelulose, lignina se apresentam como fontes interessantes para a geração deste tipo de combustível.

No Brasil, o etanol, produzido a partir da cana-de-açúcar, tem sido há vários anos utilizado como combustível, tanto na forma hidratada com uso direto nos motores a combustão, quanto na forma anidra adicionado à gasolina. Nas décadas de 30 e 70, a utilização de etanol como combustível teve grande utilidade devido a problemas de abastecimento de petróleo. Nestas ocasiões, porém, quando passadas as crises, este combustível era deixado de lado. Com a criação do Proálcool na década de 70, grandes investimentos foram feitos na produção de álcool de cana-de-açúcar, o que a transformou na melhor fonte para a obtenção deste combustível no Brasil.

A mandioca é uma raiz tuberosa da família Euphorbiaceae, rica em amido e muito consumida na dieta brasileira. É uma cultura que pode ser encontrada em toda extensão do território nacional, tanto em terras de alta fertilidade, como é o caso do sul do país, como no semi-árido, em algumas regiões do Nordeste.

Devido a sua grande quantidade de carboidratos, a mandioca se apresenta como potencial fonte para a geração de etanol. Chegou-se a implantar algumas usinas de álcool de mandioca no Brasil em períodos de grande dificuldade energética, como na década de 30 e na década de 70. Enquanto que a produção de álcool de cana de açúcar era aperfeiçoada em diversos aspectos tecnológicos e econômicos, a produção de álcool de mandioca era abandonada, sem maiores investimentos e estudos.

Esta cultura não concorre igualmente com a cana-de-açúcar devido à sua baixa produtividade agrícola no Brasil, cerca de 13 ton/ha.ano em média, e pelo fato de seus açúcares não estarem na forma diretamente fermentescível, necessitando de um tratamento prévio para obtenção do mosto. Entretanto já existem novas variedades que apresentam produtividade superior a 20 ton/ha.ano, o que pode aumentar a viabilidade da produção de álcool a partir desta fonte (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

Para que possa ser metabolizado pelos agentes de fermentação, o amido precisa ser hidrolisado a açúcares fermentescíveis, como glicose ou maltose, entre outros. O processo de transformação do amido da mandioca em açúcares fermentescíveis pela levedura alcoólica envolve o aquecimento da suspensão de amido para a sua gelatinização, a fim de facilitar a ação das amilases.

A hidrólise do amido pode ser feita de forma ácida ou enzimática, sendo a última a que apresenta maiores vantagens. Esta hidrólise é desenvolvida pelas enzimas amilases, que podem ser encontradas em tecidos animais, vegetais e microrganismos. Os maltes de cereais apresentam elevada atividade amilolítica, desenvolvidas em seus processos de germinação. Alguns microrganismos, dentre eles a levedura *Saccharomyces diastaticus*, tem também a capacidade de sintetizar enzimas amilolíticas. A busca por processos que aperfeiçoem a hidrólise do amido de

mandioca visando a obtenção de etanol se torna importante para a inclusão desta cultura genuinamente brasileira na nova matriz energética nacional. Isto traria grandes benefícios para a matriz energética brasileira contribuindo para a distribuição de renda para os pequenos produtores desta cultura, em varias regiões do país.

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a atividade amilolítica dos maltes de cevada, milho, trigo e centeio e determinar a composição físico-química desses maltes e da fécula de mandioca utilizados neste trabalho;
- Avaliar a ação das amilases de maltes de cereais sobre o amido de mandioca em diferentes concentrações enzima-substrato;
- Avaliar a cinética de fermentação e produção de etanol nos mostos obtidos a partir de amido de mandioca hidrolisados por enzimas de maltes de cereais, utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Saflager W-34/70 e *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 e determinar a composição dos produtos formados a partir das fermentações anteriores;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A história do Álcool no Brasil

A difusão da fermentação alcoólica no Brasil iniciou-se aparentemente na capitania de São Vicente, onde foi montado o primeiro engenho do país, em 1532, após a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar trazidas da ilha da Madeira. Por séculos o único álcool produzido foi empregado como bebida destilada. A industrialização do álcool propriamente dita desenvolveu-se na Europa, em meados do século 19 e no último quarto do século passado iniciou-se a produção de etanol no Brasil, com as sobras de melaço da indústria de açúcar, que ampliava a sua capacidade produtiva (AQUARONE *et al*, 2001).

O etanol derivado de cana-de-açúcar foi usado como combustível desde 1903, quando o Primeiro Congresso Nacional das Aplicações Industriais do Álcool propôs que uma infra-estrutura fosse estabelecida para promover a produção e uso de álcool. Durante a Primeira Guerra Mundial, de fato, o uso do álcool foi obrigatório em muitas áreas do país. Em 1923, a produção de etanol cresceu para 150 milhões de litros por ano; em 1927, este foi misturado com éter dietil etílico e óleo de castor. Em 1931 um Decreto Federal 19.717 de 20/02/31 determinou que fosse adicionado álcool na gasolina na proporção de 5% na mistura e estabeleceu diretrizes para seu transporte e comercialização. Em 1941, a produção de etanol atingiu 650 milhões de litros. Em 1995, esta atingiu 12.6 bilhões de litros (MOREIRA e GOLDEMBERG, 1999).

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945), faltou gasolina e fez-se necessário substituí-la por gasogênio e álcool. Passada a Segunda Guerra Mundial, voltou-se à importação de gasolina e o combustível

alternativo perdeu sua importância. Entretanto continuou-se a misturar etanol à gasolina em larga escala (AQUARONE *et al*, 2001).

A economia Brasileira nos anos 70 passou por grandes dificuldades. Após “acordar” de um período de milagre econômico”, ocorrido no governo Médici (de 1968 a 1973), ocorre um declínio econômico, devido a diversos problemas e à sua política econômica baseada principalmente em empréstimos internacionais, arrocho salarial e favorecimento de empresas estrangeiras (OLIVEIRA e NETO, 2003).

A crise internacional do petróleo que se deflagrou em 1974, fez com que se iniciasse no Brasil uma nova fase de produção de etanol. A produção saltou de 700 milhões de litros por ano para 15 bilhões de litros para abastecer a nova frota de mais de 4 milhões de automóveis projetados para utilização de álcool hidratado e também para a mistura na gasolina na forma de álcool anidro. Isto proporcionou a ampliação do parque canavieiro, a modernização das destilarias anexas, a instalação de unidades autônomas, a criação de grande número de empregos diretos e indiretos e uma rápida e importante evolução na construção de motores para esse combustível. O plano de desenvolvimento da produção de álcool no Brasil, denominado de Proálcool, não foi uma solução improvisada para a crise de combustíveis, mas simplesmente a continuidade e evolução de um programa de uso do álcool como combustível iniciado em 1931 (AQUARONE *et al*, 2001).

Apesar de ter sido implantado em 1975, foi a partir de 1979, depois do segundo choque do petróleo, que o Brasil, de forma mais ousada, lançou a segunda fase do Proalcohol, que tinha como meta a produção de 7,7 bilhões de litros em cinco anos. A intenção do Estado, anteriormente ao Proálcool, era a de aumentar a produção de alimentos e produtos exportáveis do setor, buscando a estabilidade interna e também nas contas externas. Com a criação do Proálcool, transfere-se também para a agricultura a responsabilidade de tentar superar a crise do petróleo e estabilizar as contas externas. Neste contexto, o governo em sua ação direta ou indireta, dado a ausência de recursos para atender todo o agronegócio nacional, optou por privilegiar algumas culturas e desprezar outras, como é o caso dos produtos de mercado interno, relegados a segundo plano. Uma das críticas apresentadas por muitos estudiosos é que o Proálcool tem caráter

concentrador e elitista, descuidando-se das conseqüências sociais, geradas pelos problemas nas áreas de produção de alimentos e do aumento das desigualdades regionais e setoriais (OLIVEIRA e NETO, 2003).

Segundo VEIGA FILHO e RAMOS (2006), o Proálcool pode ser caracterizado em quatro fases. A primeira, de 1975 a 1978, ocorreu pelo incentivo ao aumento da produção de etanol para utilização como combustível misturado à gasolina, através da instalação de destilarias anexas às usinas de açúcar, motivada pelo primeiro choque de preços do petróleo no mundo, em outubro de 1973, e a necessidade de aproveitar a ociosidade do parque industrial sucroalcooleiro. A segunda fase, também motivada por outro choque do petróleo, ocorreu através da implantação de destilarias autônomas, e iniciou-se em 1979, quando os preços do petróleo dispararam no mercado internacional. Essa fase terminou no episódio da falta de álcool hidratado nas bombas dos postos de combustível, em 1989. A terceira fase, iniciada após esse episódio, estende-se até a crise de superprodução de etanol, na safra 1999/2000. Nela predominou um padrão de preços baixos do petróleo no mercado internacional, desestruturação do sistema de apoio governamental, o que redundou no excesso de produção de etanol e em queda de preços. O programa se susteve pelo consumo do anidro, dada a demanda da gasolina, e pela manutenção da frota de veículos a álcool em uso. A quarta fase, após 2000, iniciou-se com a renovação do Proálcool, principalmente através de ações corporativas, articulando cada vez mais segmentos econômicos, sociais e políticos, marcada pela liberação de preços dos produtos setoriais, introdução dos veículos *flex fuel*, possibilidades de aumento nas exportações de etanol e patamares de preços elevados, nos curto e médio prazos, de petróleo no mercado mundial.

O aumento da produção e uso do etanol como combustível foi possível graças a três ações governamentais: a decisão que a Petrobras compraria uma quantidade garantida de etanol; A provisão de incentivos econômicos para empresas agroindustriais dispostas a produzir etanol, e quase US\$ 2.0 bilhões em empréstimos, os quais representaram 29% do total dos investimentos necessários a capacidade instalada presente; etapas para tornar o etanol atrativo para os consumidores pela venda na bomba por 59%

do preço da gasolina. Isto somente foi possível devido ao fato do preço da gasolina ter sido estabelecido pelo governo a um de valor aproximadamente o dobro do preço nos Estados Unidos (MOREIRA e GOLDEMBERG, 1999).

2.2 Mandioca com matéria-prima para a produção de etanol

Durante a década de 70 algumas usinas de álcool de mandioca foram implantadas, mas em regiões que não tinham tradição na produção desta cultura e devido a isto estas usinas não apresentaram resultados satisfatórios. Há hoje em dia, em algumas regiões do Nordeste brasileiro, como no estado do Maranhão, a produção de aguardente a base de mandioca, conhecida como Tiquira (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

O álcool de mandioca já foi produzido no Brasil nos períodos de grande dificuldade energética. Há relatos bibliográficos de que essa matéria-prima foi usada no período de 1932 a 1945, que corresponde ao colapso da economia mundial da década de 30 e segunda guerra mundial e na década de 70, com o advento do Proálcool. Observou-se que, uma vez cessadas as dificuldades do momento, abandonava-se a mandioca como matéria prima para a produção de álcool, prevalecendo a utilização da cana-de-açúcar (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

Segundo ARAÚJO (1982), enquanto o álcool de cana-de-açúcar conseguia, em virtude da sua produção continuada, razoáveis aperfeiçoamentos tecnológicos, nacionalização da aparelhagem, melhores resultados na fermentação, abandono dos processos arcaicos, controle das infecções, entre outros benefícios, a produção de álcool de mandioca, interrompida em 1942 com o fechamento da usina de Divinópolis, permanecera totalmente estagnada em relação à metodologia de fabricação. Criou-se então uma mística derrotista em relação ao álcool de mandioca.

A produtividade média brasileira é baixa: 13 toneladas de mandioca por hectare, mas a região de industrialização da mandioca em fécula, no sudeste, apresenta produtividade média superior a 20 t/ha. A mandioca possui uma série de vantagens em relação a outros cultivos, tais como a fácil propagação, elevada tolerância a estiagens, rendimentos satisfatórios mesmo em solos de baixa fertilidade, pouco exigente em insumos modernos,

potencial resistência ou tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, boas perspectivas de mecanização do plantio à colheita, possibilidade de consórcio com inúmeras plantas alimentícias e industriais (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003). Segundo estes mesmos autores a produtividade de etanol para a mandioca é de 4,88 m³/ha.ano. Isto daria uma produção de 376 litros de álcool por tonelada de mandioca, enquanto a cana-de-açúcar produz entre 90 e 100 litros por tonelada. Vários produtos da mandioca, como a fécula, farinha, raspas, bem como a própria raiz podem ser usados na produção de álcool, com rendimentos de 607,47, 515,2, 508,83 e 240,59 litros por tonelada respectivamente.

A supremacia da cana-de-açúcar em relação à mandioca esta ligada a quantidade de açúcar e conseqüentemente de etanol, que é possível de se produzir a partir de uma unidade de área (ha) cultivada por unidade de tempo (ano). Além disso, a cana, ao contrário da mandioca, possui açúcares fermentáveis que são diretamente metabolizados pela levedura alcoólica, não necessitando de hidrólise prévia para a produção do mosto.

2.3 Hidrólise de amido

No processo de hidrólise ou sacarificação de matérias-primas amiláceas, ocorre a transformação do amido em açúcar, o que pode se dar através de processo contínuo ou descontínuo, com hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta a vantagem de ser mais rápida, porém tem como desvantagens evidentes os problemas de corrosão de equipamentos e necessidade de neutralização (SURMELY *et al*, 2003). Na hidrólise enzimática, enzimas de origem vegetal ou microbiana podem ser usadas. Destaca-se o malte, o farelo enzimático (cultivo de microrganismos amilolíticos, como o fungo da espécie *Aspergillus oryzae*, cujo crescimento se dá em farelo de milho, trigo, arroz ou cevada, previamente gelatinizados) e enzimas comerciais obtidas de microrganismos (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

LEONEL e CEREDA (1998), trabalhando com farelo de mandioca, um subproduto da extração da fécula como matéria prima para a obtenção de álcool, utilizando pectinase como enzima complementar às enzimas

amilolíticas, concluíram que 86,31% do amido e 70,46% da matéria seca inicial foram hidrolisados neste processo. Uma redução de 23,04% do conteúdo de fibras presentes no farelo inicial foi constatada. Estes mesmos autores em 2000 obtiveram cerca de 90% de hidrólise do amido inicial contido no farelo de mandioca, utilizando enzimas comerciais.

A produção de etanol a partir de mandioca segue uma linha industrial semelhante à fabricação de álcool a partir de cereais. As principais operações envolvidas na manufatura do álcool de mandioca pelo processo enzimático de hidrólise do amido são: pesagem, lavagem e descascamento, desintegração, cozimento, pré-sacarificação, sacarificação, fermentação, peneiragem, centrifugação, destilação, retificação e desidratação. (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

LEONEL e CEREDA (1998) chegaram a obter eficiência do processo fermentativo de 86,89% em relação ao teor de glicose no mosto inicial.

BRINGHENTI e CABELLO (2005) produziram álcool a partir de amido decantado aditivado com melaço. Ao final da fermentação foram quantificados 97,64 ml de etanol por litro de mosto, ou seja, 9,76% em volume. Neste álcool observou-se ausência de álcoois superiores, metanol, glicerol e ácidos orgânicos. Furfuraldeído e formaldeído com concentrações de 0,01 e 0,004 mg/ml, respectivamente, foram os aldeídos identificados.

FERREIRA *et al* (2005), produzindo aguardente de mandioca hidrolisada com malte de milho obtiveram conversão do amido a açúcares próxima de 17%. Estes autores obtiveram uma concentração alcoólica de aproximadamente 5,5°GL no mosto. Segundo os autores, este baixo rendimento se deve provavelmente à quantidade de material insolúvel no meio (gel de amido), que diminui a disponibilidade de água.

2.4 Custos de produção do álcool

LEONEL e CEREDA, (1998), utilizando farelo de mandioca, um subproduto da produção da fécula, como matéria-prima e enzimas comerciais na hidrólise, obtiveram custo de produção de R\$ 0,90 por litro de álcool sendo que as enzimas representaram 53% dos custos. Estes mesmos autores trabalhando com farelo de mandioca, em 2000, encontraram um

custo de produção de R\$ 0,55 por litro de álcool fino de mandioca, utilizando enzimas comerciais.

BOSSO e MACHADO (2006), em estudo sobre os custos de produção de etanol no Brasil, afirmam que o produto obtido a partir de milho teria um custo de aproximadamente R\$ 0,82 por litro, enquanto que a partir da cana, este custo é de R\$ 0,35 por litro.

WOICIECHOWSKI *et al* (2002) afirmam que a hidrólise ácida de 150kg de bagaço de mandioca para produção de açúcares redutores apresentou custos de US\$ 34.27, enquanto que o processo enzimático, para a mesma quantidade custaria U\$ 2470.99, sendo que o elevado custo da hidrólise enzimática se deu devido ao tempo de hidrólise e ao alto custo das enzimas.

Os EUA são o segundo maior produtor de álcool, obtendo este a partir de milho. Comparado ao etanol produzido nos Estados Unidos, o álcool nacional ganha em preço e em produtividade. No Brasil, cada hectare plantado produz 6,8 mil litros de álcool de cana-de-açúcar e cada litro do produto custa US\$ 0,20. Nos Estados Unidos, maior produtor mundial de milho, cada hectare gera 3,2 mil litros do combustível extraído do milho, e o litro custa US\$ 0,47. Segundo estudos da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE), o álcool brasileiro leva vantagem também no que se refere ao meio ambiente. Enquanto o combustível extraído da cana-de-açúcar reduz as emissões de gás carbônico em 80%, na comparação com a gasolina, o similar norte-americano só reduz em 20%.

A redução de custos é um objetivo evidente para a produção de álcool de fontes amiláceas. Isto poderia ser atingido, dentre outras maneiras, pela redução do consumo de enzimas amilolíticas utilizadas no processo (KŁOSOWSKI *et al*, 2006). Muitos estudos têm sido desenvolvidos visando aperfeiçoar o processo de produção de álcool de amiláceos (KŁOSOWSKI *et al*, 2006, ÜLGEN *et al*, 2002, VERMA *et al*, 2000).

A produção de álcool de mandioca poderia ser incentivada em regiões onde as condições do solo são impróprias para o cultivo da cana-de-açúcar e apropriadas para esta raiz, que é uma cultura pouco exigente em fertilidade. A utilização da mandioca poderia suprir as necessidades deste

combustível durante as épocas de entressafra da cana-de-açúcar, já que esta matéria prima apresenta disponibilidade em todo ano e em todo o país.

2.5 Processos de obtenção do etanol

O etanol pode ser obtido por duas maneiras gerais: por síntese química e por via biológica ou fermentativa. A via destilatória é outra forma de se obter etanol a partir de fermentações de resíduos semi-sólidos vinícolas, porém não tem significado econômico no Brasil, a não ser em algumas regiões vinícolas, para o controle de preço de determinadas castas de vinhos de mesa. Por via sintética se obtém o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha. Nos países em que há grandes reservas de petróleo e indústria petroquímica avançada, é a forma econômica de se produzir álcool. A via fermentativa é a maneira mais importante para a produção de álcool etílico no Brasil. Mesmo que se venha a ter disponibilidade de derivados de petróleo que permitam a produção de álcool de síntese, a via fermentativa ainda será de grande importância para a produção de álcool potável, sob a forma de aguardentes (AQUARONE *et al*, 2001).

No país, podem-se considerar dois tipos de destilarias de álcool: as anexas e as autônomas. As primeiras são parte integrante de uma usina de açúcar, podendo utilizar o caldo ou méis e as segundas são independentes, com matéria prima própria (CAMPOS, 1982).

2.6 Matérias-primas para obtenção de etanol

Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção é o grande número de matérias primas naturais existentes em todo o país. Sua privilegiada distribuição geográfica, que encerra diversos climas e tipos de solos, permite a produção em quase todo o território e durante todo o ano. Qualquer matéria que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima potencial para a obtenção de etanol (AQUARONE *et al*, 2001)

Há várias maneiras de classificar as matérias primas para a produção de etanol, mas qualquer dos critérios que se adote deixa algo a desejar. Pode-se classificá-las em matérias açucaradas, agrupando a cana, a beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas; em matérias amiláceas e feculentas, agrupando grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos como mandioca, batata doce, babaçu; e em matérias celulósicas, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfiticos de fábricas de papel (STUPIELLO, 1982).

Segundo STUPIELLO (1982) ainda que todo produto que contenha carboidratos transformáveis em álcool – sacarose, glicose, frutose, amido, celulose, etc. – possa ser considerada matéria-prima para a fermentação alcoólica, é imprescindível considerações sobre os seguintes pontos: custo aquisitivo da matéria-prima; facilidade de transformação; rendimento em álcool; disponibilidade e possibilidade de expansão; fonte de energia empregada.

Dentre as matérias açucaradas costuma-se distinguir as diretamente fermentescíveis e as não diretamente fermentescíveis. As primeiras são as que contêm monossacarídeos e se limitam aos sucos de frutas. Sua importância reside na produção de álcool em bebidas como o vinho e a cidra. As não diretamente fermentáveis são as que contêm dissacarídeos, que fermentam após uma hidrólise, a qual se dá o nome de inversão, e que se realiza naturalmente por ação da invertase, enzima produzida pelo agente de fermentação. A sacarose é a representante mais importante dos componentes da cana de açúcar e dos melaços (AQUARONE *et al*, 2001).

A disponibilidade e forma dos açúcares são importantes já no processo de transporte para o interior da célula fermentativa de *Saccharomyces*. Alguns açúcares já podem ser indisponíveis para a fermentação a partir desta etapa, como é o caso da lactose, que não é fermentescível por *Saccharomyces* devido à restrição no sistema de transporte, hidrólise e metabolismo da galactose (HOUGH *et al* 1995)

O sistema de transporte de açúcares (mono e dissacarídeos) através da membrana celular pode ser entendido na Figura 1 a seguir:

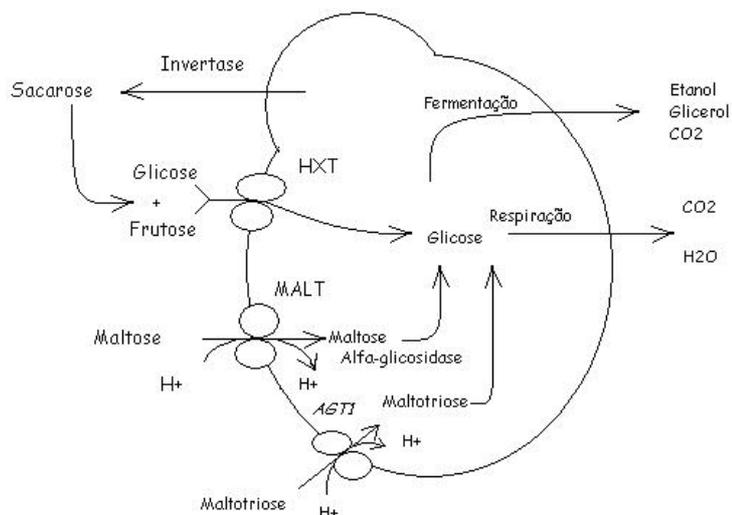


Figura 1: Transporte de açúcares através da membrana celular da levedura.
 Fonte: (ZASTROW e STAMBUK, 2000).

O transporte dos açúcares através da membrana é dependente de transportadores específicos para cada tipo de açúcar. Estes transportadores são as permeases, que são proteínas transportadoras codificadas por genes específicos (ZASTROW e STAMBUK, 2000).

Processos alternativos, como a utilização de madeira e dos resíduos desta para se formar carboidratos solúveis, foram praticados na Alemanha, durante a segunda guerra mundial. Neste processo, havia inicialmente a produção de açúcares por hidrólise ácida, que eram posteriormente, fermentados pela levedura. O produto final era empregado como alimento ou suplemento alimentício (MENEZES, 1982)

A massa de matérias celulósicas disponível é vultuosa, mas ainda não oferece ao país condições econômicas para a produção de etanol. O processo de hidrólise, necessário para sacarificar a celulose é complexo, e o teor de açúcares fermentescíveis a ser obtido é inferior ao encontrado nas matérias-primas sacarinas (AQUARONE *et al*, 2001). Entretanto, esta via tem sido bastante pesquisada atualmente no Brasil e no exterior.

2.7 Mandioca

2.7.1 Aspectos gerais da planta

A mandioca (*Manihot esculenta*) pertence à família *Euphorbiaceae*, uma das maiores dentro das dicotiledôneas. Nesta família, são encontrados 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e África (Barroso citado por DALLAQUA e CORAL 2002). Apresenta-se como um arbusto de 2 a 3 metros de altura, de raiz tuberosa, com alto valor como alimento quando cozida dependendo da variedade, mas de alto valor tóxico quando crua (Reitz citado por DALLAQUA e CORAL, 2002). As raízes são utilizadas na alimentação humana, na forma de farinha, fécula ou polvilho, tapioca, ou ainda frita ou cozida (Cereda citado por DALLAQUA e CORAL 2002).

Para completar um ciclo de crescimento, a planta de mandioca passa por cinco fases fisiológicas principais, sendo quatro ativas e uma de repouso vegetativo. Estas fases de desenvolvimento são: brotação da maniva (broto do caule que dá origem uma nova planta), formação do sistema radicular, desenvolvimento da parte aérea, engrossamento das raízes de reserva e fase de repouso. Esta planta tem uma fisiologia diferente dos cereais. Neste último grupo, nas plantas, primeiramente se processa o crescimento vegetativo para depois iniciar o crescimento reprodutivo que é o de interesse econômico. Ao contrário, na mandioca ocorre ao mesmo tempo o crescimento da parte aérea e das raízes fibrosas e a deposição do amido nas raízes de reserva. Este crescimento simultâneo da parte aérea e engrossamento das raízes fibrosas com amido trazem para a cultura da mandioca uma série de problemas que não ocorrem nos cereais. Nestes não existe competição pelos produtos da fotossíntese entre os órgãos vegetativos e de armazenamento das reservas, enquanto que na mandioca, ocorre uma competição entre a parte aérea e o sistema radicular pela utilização e pelo armazenamento de amido (TERNES, 2002).

2.7.2 Utilização da mandioca no Brasil

Tradicionalmente, as variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) apresentam duas denominações: de *mesa*, para o consumo humano e *industrial*, para o processamento em farinha, fécula ou mesmo alimentação animal. A mandioca de uso culinário recebe diferentes denominações nas diversas regiões do Brasil, tais como aipim, macaxeira ou mandioca de mesa. A mandioca é de grande utilização na alimentação humana em todo o país. Uma grande variedade de produtos pode ser obtida a partir da mandioca, como a farinha de mesa, fécula ou polvilho doce, beiju, carimã ou massa puba, tucupi, tacacá e também a folha de mandioca é consumida em um prato tipicamente da Amazônia chamado maniçoba (MATTOS *et al*, 2002). Atualmente, novos produtos têm sido desenvolvidos com o objetivo de agregar valor a esta cultura como a mandioca minimamente processada, embalada a vácuo, pré-cozida congelada, fritas, chips e snacks (VILPOUX e CEREDA, 2003).

Para as famílias nas faixas de renda de menos de um salário mínimo, o consumo de mandioca e seus derivados representa em torno de 10% da despesa anual em alimentação, atrás apenas do feijão, com consumo equivalente a 13% dessa renda (CARDOSO e SOUZA, 2002).

Um fluxograma da produção de fécula de mandioca está apresentado na figura 2 a seguir:

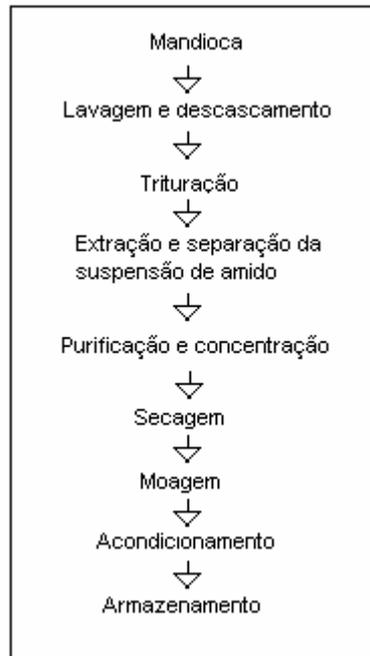


Figura 2: Fluxograma da produção de fécula de mandioca

A produção anual de fécula de mandioca no ano de 2006 foi de 574,8 mil toneladas, volume 5,1% maior que o de 2005. Apesar disso, em 2006 o valor médio da produção de fécula no Brasil ficou 7% menor que o observado em 2005 (R\$ 401,6 milhões), totalizando R\$ 373,5 milhões. Em 2006, o principal setor comprador foi o de papel e papelão, adquirindo mais de 26% da produção total. O segundo principal setor comprador foi o de frigoríficos (19,5%), seguido por atacadistas (16,8%), massas, biscoitos e panificação (14,5%), indústrias químicas (6,6%), setor têxtil (4,9%) e varejista (4,8%). A compra de fécula por outras fecularias (transação dentro do setor) representou 3,1%. Em 2006, os preços chegaram a ser inferiores aos custos de produção, diminuindo a rentabilidade do produtor e reduzindo o interesse pelo plantio de novas áreas (CEPEA/ESALQ, 2006).

Para produzir uma tonelada de raiz de mandioca o produtor rural gastou em 2006 R\$ 110,95 (sem considerar juros cobrados por empréstimos para execução do plantio, o que elevaria este valor para R\$ 125,16/tonelada), enquanto que o preço mínimo do Governo Federal era de R\$ 54,00 por tonelada. Considerando-se este valor, a produção de uma saca de 25 quilos de fécula de mandioca custa R\$ 15,61, contra os R\$ R\$ 11,00 do preço mínimo estabelecido pelo Governo. Também com base no mesmo

parâmetro, a saca de 50 quilos de farinha de mandioca tem custo de R\$ 24,64, enquanto o Governo tem como preço mínimo o valor de R\$ 15,00. (PORTO, 2006; MELO 2006).

2.3 Amido

O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose. O material puro pode ser obtido por processos simples a partir de partes de plantas como sementes, caules e raízes (HIZUKURI, 1996). O amido se armazena em órgãos de reserva durante uma fase do ciclo de vida da planta para ser utilizado mais tarde em outros ciclos. Amidos de órgãos de reserva de várias plantas têm importância comercial (SHANNON e GARWOOD, 1984).

Amido pode ser encontrado em todos os órgãos de muitas plantas superiores. Órgãos que contêm amido incluem pólen, folhas, raízes, bulbos, rizomas, frutas, flores e no pericarpo, cotilédones, embrião e endosperma das sementes. Além das plantas superiores, amido é encontrado em musgos, samambaias e alguns protozoários, algas e bactérias (SHANNON e GARWOOD, 1984).

A fórmula geral do amido é $(C_6H_{10}O_5)_n$. As unidades de glicose estão ligadas entre si pelos carbonos C1 - C4 e C1 - C6, através de oxigênio, formando ligações glicosídicas α (1-4) e α (1-6) (SURMELY *et al*, 2003).

O amido possui dois tipos de polímeros da glicose, a amilose e a amilopectina. O primeiro consiste de cadeias longas, que acreditava-se serem não ramificadas de unidades de D-Glicose unidas por ligações α (1-4). Tais cadeias variam em peso molecular de uns poucos milhares até 500.000. A amilopectina também tem peso molecular alto (até 1 milhão), porém é altamente ramificada. As ligações glicosídicas unindo os resíduos de glicose nas cadeias de amilopectina são α (1-4), mas os pontos de ramificação, que ocorrem entre cada 24 e 30 resíduos, são ligações α (1-6) (LEHNINGER, 1995).

Embora a amilose seja definida como linear, é reconhecido agora que algumas moléculas de amilose tenham várias ramificações, como na amilopectina (HIZUKURI, 1996). Os grânulos de amido são estruturas semi-

cristalinas compostos de macromoléculas lineares e ramificadas arranjadas na direção radial. Essas moléculas formam pontes de hidrogênio, pois estão associadas paralelamente, o que resulta no aparecimento de regiões cristalinas ou micelares (FRANCO *et al*, 2002).

A cristalinidade do grânulo de amido gira em torno de 15% a 45%. (FRANCO, *et al* 2002). Nos grânulos de amido nativo, um grande número de cadeias macromoleculares está organizado em estruturas cristalinas. Três padrões de cristalinidade foram encontradas por difração de raio-X, os padrões A, B e C. Somente as estruturas A e B estão bem conhecidas. Existe uma variação na susceptibilidade dos grânulos de amido a digestão enzimática, isto é explicado pela variação na morfologia do grânulo e sua organização cristalina (GALLANT *et al*, 1992).

O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos leva à formação de zonas de deposição mais ou menos densas. As cadeias de amilopectina estão radialmente arranjadas dentro do grânulo com seus terminais não redutores em direção à superfície, e estas são organizadas alternando áreas cristalinas (em forma de dupla hélice) e amorfas (região com pontos de ramificação) com periodicidade de 9 nm. Esse arranjo dificulta a entrada de moléculas como as de água e enzimas, apresentando-se portanto mais resistente ao processo de hidrólise (FRANCO *et al*, 2002).

A estrutura do grânulo de amido está intimamente ligada ao seu desenvolvimento na célula viva. O amido armazenado nas células das sementes, raízes, dos tubérculos, etc., acha-se depositado como grânulos mais ou menos brilhantes apresentando formas e dimensões diversas. O grânulo de amido de mandioca apresenta forma esférica ou hemisférica, com diâmetro variando entre 11 e 12 μm enquanto que o do milho ceroso apresenta forma apresenta forma poliédrica com 12 μm de diâmetro (FRANCO *et al*, 2002).

Os amidos podem ser classificados em função de sua susceptibilidade à ação enzimática. Em ordem decrescente de susceptibilidade são citados os amidos de milho ceroso, mandioca, sorgo ceroso, sorgo, milho, arroz, sagu, araruta e batata. Observam-se dois padrões de degradação enzimática dos grânulos: erosão e fragmentação extensiva dos grânulos nos

amidos de milho e sorgo (normais e cerosos) e destruição seletiva nos grânulos de outros amidos. Os amidos de mandioca, entre os amidos de outras fontes botânicas que não os cereais, são dos menos resistentes a degradação enzimática. Não está claro se é a amilose ou a amilopectina a fração mais atacada quando se faz o tratamento enzimático dos grânulos de amido (FRANCO *et al*, 2002).

Segundo FRANCO e CIACCO (1997), a susceptibilidade enzimática à ação da α -amilase e amiloglicosidase foi maior para o amido de milho ceroso do que para o milho comum. Isto estaria relacionado não só com teor de amilose, mas também com as diferenças de estrutura dos grânulos de amido.

O conteúdo de amilose do grânulo parece ser um dos fatores envolvidos na resistência do amido (tanto para hidrólise ácida como enzimática). Isto está evidente em amidos contendo altos níveis de amilose (por exemplo, ervilha enrugada e grânulos B pequenos do trigo) são mais resistentes ao ataque enzimático que os amidos correspondentes com menor conteúdo de amilose (milho normal e *waxy*, ervilha lisa e grânulos de trigo grandes do tipo A, respectivamente) (GALLANT *et al*, 1997).

Batatas não mutantes têm, no entanto, conteúdo normal de amilose (24%) e é altamente resistente à enzima, indicando assim que o conteúdo de amilose no grânulo não pode completamente descrever a resistência do grânulo à enzima. As camadas cristalinas e amorfas da amilopectina organizadas dentro de estruturas mais ou menos esféricas chamadas bloquetes. A resistência enzimática do amido de batata deve estar ligada ao grande tamanho dos bloquetes, mas pode também indicar que a extensão da interação da amilose com a amilopectina influencia a cristalinidade e a resistência. Além do mais, a localização da amilose dentro dos grânulos pode influenciar a cristalinidade e resistência local. É conhecido que existe um enriquecimento de amilose na superfície do grânulo em muitos amidos, incluído trigos e batata, o qual pode ser responsável pelo aumento da resistência na superfície do grânulo (GALLANT *et al*, 1997).

A resistência do amido a ação das enzimas da digestão pode se dar de três maneiras: o amido fisicamente inacessível na matriz do alimento, por causa das paredes celulares e proteínas; o amido granular nativo, que é

resistente às enzimas devido a sua compacidade e estrutura parcialmente cristalina, podendo ser convertido por gelatinização; e polímeros de amidos retrogradados (principalmente amilose), produzidos quando o amido é resfriado após a gelatinização (LOBO e LEMOS SILVA, 2003).

A taxa de hidrólise do grânulo de amido depende muito da distribuição das camadas cristalinas e semicristalinas e do tamanho, identidade e interação dos seus constituintes. Amidos de batata e *amylomaize* (ambos com padrão cristalino B e considerados amidos resistente) apresentam a camada periférica espessa composta de grandes bloquetes empilhados, o que explica a baixa taxa de hidrólise nestes amidos (GALLANT *et al*, 1997).

2.4 Enzimas

2.4.1 Definição

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas. Sua atividade catalítica depende da integridade da conformação protéica nativa. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica é geralmente perdida. Se uma enzima é quebrada em seus aminoácidos componentes, sua atividade catalítica é sempre destruída. Assim as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para sua atividade catalítica. Algumas enzimas não requerem nenhum grupo químico para atividade além dos grupos aminoácidos. Outras requerem um componente químico adicional chamado cofator – um ou mais íons inorgânicos tais como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , ou Zn^{2+} , ou um complexo orgânico ou molécula metalorgânico chamada coenzima (LEHNINGER, 2005)

As enzimas são substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas, devido à complexidade de suas estruturas químicas. Com algumas exceções, são solúveis em água e em álcool diluído, e quando em soluções são precipitados pela adição de sulfato de amônio, álcoois ou ácido tricloroacético. São inativadas pelo calor e esta talvez seja a característica mais importante destes compostos em relação a tecnologia de alimentos (BOBBIO, 1995).

A ação catalítica das enzimas se faz como a dos catalisadores inorgânicos, através da redução da energia de ativação da reação ou alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além de reduzirem significativamente a energia de ativação, as enzimas apresentam alta especificidade, que pode se expressar quanto ao tipo de reação ou de substrato. Apenas alguns resíduos aminoácidos participam diretamente da ação catalítica, embora cadeias de aminoácidos situadas próximas ao sítio catalítico tenham importante função de fixação e posicionamento da molécula de substrato (AQUARONE *et al*, 2001).

As reações necessárias para digerir alimentos, enviar sinais através dos nervos, ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise. Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma reação dada é energeticamente favorável. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade chamada sítio ativo (LEHNINGER 1995).

Enzimas podem ser obtidas de fontes animais (pancreatina, pepsina, renina, catalase), de fontes vegetais (papaína, bromelina, ficina, amilases do malte) ou a partir de microrganismos (AQUARONE, 2001).

2.4.2 Enzimas Amilolíticas

As amilases são uma classe de hidrolases vastamente distribuídas na natureza. Estas agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido. Atuam na digestão, como as amilases salivar e pancreática, na germinação de grãos e no crescimento microbiano (HIZUKURI, 1996; WHITAKER, 1994). Existem diversos tipos de enzimas amilolíticas e elas têm utilizações em varios tipos de indústrias como a de papel, têxtil, panificação, produção de xaropes, álcool, bebidas, dentre outras.

As α -amilases são encontradas em animais, plantas e microrganismos (HIZUKURI, 1996, WHITAKER, 1994). As β -amilases são abundantemente encontradas em plantas, especialmente em trigo, soja, batata doce e algumas culturas de microrganismos (*Bacillus polymyxa*, *B. cereus* e *B. megaterium*) (HIZUKURI, 1996).

A β -amilase (EC 3.2.1.2, α -1,4 glicano-maltohidrolase) é uma exoenzima a qual tem uma ação rigidamente ordenada. Ela ataca a amilose e a amilopectina somente a partir de extremidades não redutoras e sequencialmente hidrolisa toda ligação α (1-4) posterior. Isso gera maltose (um dissacarídeo fermentescível) e uma nova molécula de amido com reduzido peso molecular. A β -amilase é capaz de repetir essa ação com grande velocidade, especialmente na presença de grandes moléculas pelas quais ela tenha alta afinidade. Sob essas condições ela provavelmente faz múltiplos ataques primeiramente em uma cadeia de amilose ou amilopectina e depois começa a agir em outra. Esta é a condição para uma ação mais rápida. Sua taxa de atuação é consideravelmente baixa com pequenas moléculas pelas quais ela tem pouca afinidade. A ação da enzima também diminui e para de agir à medida que se aproxima dos pontos de ligação α (1-6) da amilopectina. A β -amilase, atuando sozinha (e tendo tempo suficiente), é capaz de converter a amilose quase inteiramente à maltose. Em contraste, esta ataca somente as regiões externas da amilopectina liberando não mais que 10% a 15% dos resíduos de glicose como maltose e deixando β -dextrinas limites. A β -amilase precisa acessar o interior da estrutura da amilopectina, a qual compreende 75 a 80% do amido nativo, e representa a maior parte extrato potencial do amido. (SANTANA, 2003, LEWIS e YOUNG, 1995, KENT, 1975).

As moléculas de amilose linear são completamente degradadas a maltose se as moléculas forem compostas de um mesmo número de resíduos glicosil e uma molécula de glicose é produzida no final se elas incluírem um número ímpar de resíduos. Entretanto, maltotriose pode permanecer por ser difícil de ser hidrolisada (HIZUKURI, 1996).

Na ausência de α amilase, a β amilase quebra por volta de um terço da amilopectina, deixando como resíduo, dextrinas de maior massa molar altamente resistentes, conhecida como dextrinas limites. Entretanto, na presença de pequenas quantidades de α amilase, a β amilase é hábil a renovar seu ataque às extremidades não redutoras das porções de moléculas liberadas pela α amilase (KENT, 1975).

A batata doce também apresenta quantidades consideráveis de β -amilase (BOYER, 1971). A enzima cristalizada pode ser preparada por processos bastante simples a partir de batata doce, incluindo recristalização a partir de sulfato de amônio (HIZUKURI, 1996). Da cevada malteada prepara-se a β -amilase separando-a da α -amilase por extração fracionada. A β -amilase tem pH ótimo na faixa de 4,0 e 6,0 e temperatura ótima na faixa de 30°C a 50°C. O peso molecular destas enzimas está compreendida entre 150 KDa e 200 KDa.

A α -amilase (EC 3.2.1.1; α -1,4 glicano 4-glicanohidrolase) é uma endoenzima. Tal como a β -amilase, ela ataca somente as ligações α (1-4), mas de forma aleatória. Desta maneira, qualquer ligação α (1-4) na molécula de amido (exceto aquelas próximas de uma ligação α (1-6) em um ponto de ramificação) é possível sofrer hidrólise como qualquer outra. Assim, a α -amilase produz quantidades significativas de açúcares fermentescíveis (glicose, maltose e maltotriose) somente quando ela atua em moléculas relativamente pequenas. Entretanto, a α -amilase de *Thermoactinomyces vulgaris* fracamente hidrolisa ligações α (1-6) (HIZUKURI, 1996).

A α amilase rompe as ligações α (1-4), ao acaso dentro da molécula de amido, de maneira que se formam pequenas cadeias de dextrose, denominadas dextrinas. Isto torna a pasta gelatinizada menos consistente e fornece maior número de terminais de cadeias para a ação das enzimas sacarificantes. Esta enzima não rompe as ligações α (1-6), portanto, todos os pontos de ramificação ficam intactos após o tratamento com a α amilase (MENEZES, 1982). Por esta razão, esta enzima é comumente denominada de enzima liquidificante.

A α amilase abre as moléculas maiores de amido (especialmente amilopectina), para que a ação da β -amilase seja facilitada. Toda ligação α (1-4) hidrolisada pela α amilase cria uma nova extremidade não redutora onde a β -amilase pode agir. Entretanto, como a β amilase trabalha melhor em moléculas maiores, o excesso de α amilase, que quebra o amido rapidamente, reduzindo-o a dextrinas, pode ser prejudicial para a fermentabilidade do mosto. Assim, a quantidade relativa da ação da α e β -

amilases em uma mistura afetam fortemente as propriedades do mosto (SANTANA, 2003, LEWIS e YOUNG, 1995, KENT, 1975).

O massa molar da α -amilase varia de 10 a 210 KDa, dependendo da sua origem. As α -amilases microbianas apresentam peso molecular entre 50 e 60 KDa (Gupta citado por SPIER, 2005), sendo que as α -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78 KDa e as α -amilases fúngicas de 41 a 69 KDa (Pandey citado por SPIER, 2005).

De acordo com SPIER (2005), o pH ótimo para a α -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0. Possui caráter ácido e é solúvel em água. Sua atividade diminui rapidamente em temperaturas acima de 50°C, mas na presença de um excesso de íons cálcio a desativação pode ser diminuída.

Os íons de cálcio atuam como cofatores das α -amilases, estabilizando-as, dentro de certos limites, contra a desnaturação produzida pelo calor e álcalis. Por outro lado, íons como o de cobre e do mercúrio inibem a β -amilase, já que interagem com os grupos sulfidríla do centro da enzima, bloqueando sua atividade (QUAGLIA, 1991).

Cereais, como cevada, trigo, centeio e arroz apresam pouca ou nenhuma α -amilase, mas esta aumenta rapidamente sua atividade durante a germinação (HIZUKURI, 1996).

A faixa de atuação das α -amilases de cereais esta compreendida entre 55°C e 80°C. O pH ótimo para a sua atividade nos cereais esta entre 5,2 e 5,4. As amilases têm escassa ação sobre o amido intacto, tendo maior ação após a gelatinização do amido. (QUAGLIA, 1991).

BIAZUS *et al* 2006 concluíram que as faixas de pH e temperatura ótimas das amilases do malte de milho estão entre 4,3 e 6,0 e 50°C e 80°C, respectivamente.

A faixa ótima de temperatura para atividade das α -amilases é de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte, sendo que as bacterianas apresentam maior estabilidade frente às temperaturas superiores a 40°C, com atividade ótima em torno de 70°C. (Reed citado por SPIER 2005).

As enzimas do malte já foram utilizadas anteriormente na hidrólise de amido visando a produção de álcool. Tanto na usina de Divinópolis, quanto em outras poucas usinas existentes na época, a técnica de produção

baseava-se nos métodos alemães de fermentação de batata, utilizando malte de milho para sacarificação do amido, porém esta idéia não foi muito aplicada nem estudada. (ARAÚJO, 1982)

As pesquisas com as α -amilases bacterianas tem recebido grande atenção nos últimos anos devido à sua maior termoestabilidade. Entretanto, a sua utilização para a liquefação do amido tem se constituído na unidade operacional mais cara do processo de sacarificação principalmente por serem produzidas por fermentação submersa (Souza citado por SPIER, 2005).

O quadro 1 apresenta algumas diferenças entre amilases de diferentes fontes.

Quadro 1: pH, temperatura ótima e temperatura de inativação de alguns tipos de α -amilases de diferentes fontes.

Origem	pH Ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Temperatura de inativação (°C)
Pancreática	6,9 (7,0-8,8)	46	55
Fúngica	5,0 (5,5-8,5)	55	82
Malte	5,0 (4,9-9,1)	60	80
Bacteriana	7,0 (4,8-8,5)	70	93

Fonte: QUAGLIA, 1991.

A 75°C a atividade da α -amilase proveniente dos fungos é reduzida para menos de 10%, enquanto que a dos cereais é reduzida para aproximadamente 30% e das bactérias em torno de 80%. O comportamento das α -amilase também é diferente em meio ácido. A proveniente dos fungos é a que apresenta melhor ação em meio ácido (pH = 5,0), enquanto que a oriunda de bactérias tem seu pH ótimo ao redor de 7,0 (QUAGLIA, 1991).

Segundo MENEZES (1982), uma outra enzima atua no amido é a α -glicosidase, que ataca as ligações α (1-4), das moléculas de maltose e, em menor grau, as dextrinas, formando glicose.

A amilglicosidase (EC 3.2.1.3 α -D-1,4 glicanglicohidrolase), ou também conhecida como glicoamilase ou γ amilase, é uma exoenzima que

catalisa a reação de hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras do amido e de outros polissacarídeos transformando-os em glicose. Sua vantagem reside no fato de alcançar altos rendimentos, próximos ao estequiométrico (BOYER, 1971).

A amiloglicosidase é, em sua maior parte, produzida por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo que, dentre essas, a amiloglicosidase de *Aspergillus* é a mais termoestável. A amiloglicosidase catalisa eficientemente a hidrólise do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura (SANTOS, 2006).

Moreira citado por SANTOS (2006), relatam em seu trabalho que as enzimas α -amilase e amiloglicosidase parcialmente purificadas exibiram máxima atividade na faixa de pH entre 4,5 a 6,0, apresentando grande estabilidade sob condições ácidas (pH 4,0 a 7,0). A máxima atividade ocorreu em temperaturas entre 50°C e 60°C, apresentando estabilidade por mais de 10 horas à 55°C. O quadro 2 abaixo apresenta algumas características das amilases.

Quadro 2: características dos diferentes tipos de amilases sobre o amido.

Característica	α-amilase	β-amilase	Glicoamilase
Especificidade	Ligação α -1,4	Ligação α -1,4	Ligação α -1,4 e α -1,6
Mecanismo	Endoamilase	Exoamilase	Exoamilase
Principal produto da hidrólise	Dextrinas	Maltose	Glicose
Diminuição da consistência	Rápida	Lenta	Lenta
Perda da cor do iodo	Rápida	Lenta	Lenta
Aumento do poder redutor	Lento	Rápido	Rápido
Produção de glicose	Lenta	Não	Rápido
Produção de maltose	Lenta	Rápida	Não
Produção de dextrinas	Rápida	Lenta	Lenta

Fonte: QUAGLIA, 1991.

A pululanase (α -dextrina-6 glucanohidrolase, EC 3.2.1.41) é um tipo de enzima amilolítica. É uma endo amilase desramificadora que hidrolisa as ligações α (1-6) do pululano (um polímero linear de com cerca de 250 unidades de maltotriosil unidas por ligações α (1-6) e as α e β dextrinas limites da amilopectina e glicogênio (WHITAKER, 1994). A pululanase pode ser produzida por bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Aerobacter aerogenes* (HIZUKURI, 1996).

Esta enzima parece hidrolisar as ligações α (1-6) prontamente em polissacarídeos, mas não em polímeros menores e nos dímeros isomaltose e panose. Ela requer que cada duas cadeias de amilopectina ligadas por

uma ligação α (1-6) contenham no mínimo duas unidades de glicose ligadas por ligação α (1-4) adjacentes (WHITAKER, 1994).

Uma enzima muito similar a pululanase é encontrada em uma grande variedade de plantas superiores fava, batatas, pêra, arroz e grãos germinados de cevada, sorgo e milho doce, chamada de R-enzima ou dextrinase limite. Ela desramifica amilopectina, β dextrinas limites da amilopectina e os mesmos tipos de oligossacarídeos que a pululanase de *Aerobacter*. Ela também hidrolisa pululano e não mostra ação no glicogênio e β dextrinas do glicogênio (HIZUKURI, 1996; BOYER, 1971).

2.5 Malte

A utilização do malte para a produção de bebidas alcoólicas data de épocas remotas, sendo a cevada uma das suas formas mais conhecidas. A diastase (amilase) do malte foi uma das primeiras enzimas a serem identificadas no início do século XIX. Desde então as enzimas do malte têm sido intensamente estudadas. A partir do malte de cevada e de outros cereais, é possível extrair uma variedade muito grande de enzimas, tais como: proteases, lipases, oxirredutases e hemicelulases, sendo as amilases as principais enzimas contidas no malte (AQUARONE, *et al* 2001)

2.5.1 Produção do malte

A malteação inicia com a maceração, onde o cereal absorve água, a respiração aumenta lentamente no início do processo e rapidamente depois, causando acúmulo de CO₂. Para evitar este inconveniente, a água deve ser trocada várias vezes e a massa de grãos deve ser aerada constantemente. A água deve ser potável, e gelada. Entre as trocas de água, ar é bombeado através da massa de grãos. A umidade se eleva de aproximadamente 12% a 13% para 42% a 46%. A maceração dura geralmente de 40 a 50 horas ou mais em poucos casos, e a temperatura da água deve ser de 10° a 15°C (LEWIS e YOUNG, 1995).

Nesta fase formam-se as enzimas que compõem o malte. O cereal é formado por embrião, endosperma, camada de aleurona, e recobrimdo todo o grão, o epicarpo. Aproximadamente 90% do grão são constituídos de amido. A camada da aleurona é responsável pelo fornecimento de enzimas que atuam na hidrólise do endosperma. Muitas destas enzimas são liberadas em resposta às mensagens enviadas pelo embrião, na forma de um hormônio chamado ácido giberélico. Outras enzimas estão presentes nos grãos antes de sua germinação, como é o caso das β amilases (QUAGLIA, 1991, AQUARONE *et al*, 2001, KENT, 1975).

Acompanhando o aumento da atividade enzimática, a qual mobiliza substâncias de alto peso molecular no grão e permite sua translocação do embrião para fazer novos tecidos durante o crescimento, há um considerável aumento da taxa de respiração do grão - processo no qual o material amiláceo é convertido em dióxido de carbono e água. As perdas de matéria seca durante a malteação, devido a respiração, são de 5% a 9% geralmente, dependendo do tempo em que o grão permanece na malteação. A perda é minimizada quando a germinação é rápida e uniforme (KENT, 1975).

A duração do processo de germinação depende da velocidade com que as enzimas hidrolíticas alteram o endosperma. A faixa de temperatura empregada na germinação varia de 5°C a 25°C, com um ótimo em torno de 15°C. Entre as várias enzimas produzidas durante este processo, as mais importantes são as α amilases e β amilases (LEWIS e YOUNG, 1995).

Várias enzimas são liberadas durante a germinação: entre as primeiras está a citase, uma enzima que dissolve o material de ligação das paredes celulares do endosperma e ajuda a liberar o amido contido no grão nas células do endosperma. Outras enzimas que se tornam ativas nos primeiros estágios incluem fosfatase, fitase, hemicelulase e protease. As amilases se tornam ativas em estágios posteriores (KENT, 1975).

As proteases são responsáveis pela hidrólise de proteínas insolúveis em água, degradando-as em aminoácidos que serão utilizados na síntese de novas proteínas durante a germinação. Além disso, as matrizes protéicas que envolvem os grãos de amido devem ser degradadas antes da α amilase atuar sobre elas. O tempo de germinação varia de acordo com a qualidade

do malte que se quer obter. Normalmente, a germinação é interrompida no momento em que a quantidade de enzima produzida e as modificações do endosperma atingem os níveis ideais, muitas vezes determinado de acordo como o tamanho do broto germinado (AQUARONE *et al*, 2001).

A secagem com ar aquecido reduz o conteúdo de umidade do malte de 45% a 50% para cerca de 3 a 5%. A secagem deve atingir baixa umidade no malte e o sabor desejado. Isto requer calor, porém deve conservar as enzimas, as quais o calor pode inativar. Entretanto as enzimas são muito mais estáveis ao calor no malte seco do que no malte úmido. O processo de secagem do malte se divide em três estágios. No primeiro, o produto encontra-se bastante úmido e a água superficial do grão e aquela das camadas inferiores, próximas à superfície, podem ser facilmente removidas pelo uso de correntes de ar elevados, à temperaturas de 50°C a 60°C. Nesta fase, a evaporação da água dos grãos esfria-os fazendo com que as enzimas do malte não sejam tão sensíveis à temperatura inicial do ar de entrada. Durante esta fase o teor de umidade do malte é reduzido para 23% a 25% em base úmida. No segundo estágio, a umidade deve difundir das camadas mais profundas do grão para a superfície e, então, ser removida. A umidade é reduzida para 12%. O grão encolhe à medida que é seco, e isto reduz a distância que a água deve percorrer no grão, como também a área superficial na qual ela pode ser vaporizada. Se a temperatura e o volume de ar de secagem permanecerem os mesmos, o ar de saída carrega menos água que a sua carga máxima, sendo necessário um aumento de temperatura para próximo a 70°C, para aumentar a eficiência de secagem. Quando a cevada encontra-se abaixo de 12%, há praticamente, apenas a água de constituição e, para removê-la, a temperatura do ar deve ser novamente elevada. Geralmente, neste estágio são usadas temperaturas de 80°C a 85°C. Neste terceiro estágio, a umidade é reduzida de 12 para 5%, e quando o grão se aproxima de 5% o malte está curado e, então, é deixado em repouso de 4 a 8 horas, até alcançar umidade final de 3% a 5% (LEWIS e YOUNG, 1995).

BIAZUS *et al* (2005), estudando a produção de malte de milho, afirmam que a máxima atividade enzimática nas sementes germinadas foi obtida no

quarto dia e a melhor condição de secagem foi a temperatura de 54 °C e em tempo menor ou igual à 6 horas.

Segundo BIAZUS *et al* (2006), as amilases do malte de milho apresentam faixa ótima de pH entre 4,3 e 6,0 com temperaturas ótimas a 50°C e 80°C.

O malte de sorgo é muito utilizado em diversas partes do mundo. Uma das suas principais aplicações é na cerveja de Kaffir, uma bebida tradicional dos habitantes do sul da África. Para um maior desenvolvimento do poder diastático, é necessária uma temperatura de 25° C a 35° C e a manutenção de umidade elevada. O malte de sorgo é rico em α amilase, sendo apenas 18 a 39% de sua atividade amilolítica é devida a β amilase (WALL e ROSS, 2004).

DEWAR *et al* (1997) estudaram o efeito do tempo, temperatura e aeração na qualidade do malte de sorgo e relatam que o tempo e a temperatura de maceração tiveram um efeito altamente significativo na qualidade do malte de sorgo. De maneira geral, a qualidade do malte aumentou como o tempo de maceração de 16h a 40 h. O poder diastático teve elevação com o aumento da temperatura de maceração acima de 30°C.

GEORG-KRAEMER *et al* (2001) estudaram dez cultivares de cevada brasileira. Estes autores concluíram que para os cultivares analisados, existiu alta atividade das amilases por volta do quarto dia de germinação, indicando que a germinação poderia para neste momento. Alguns cultivares mantiveram alta atividade amilolítica até o último dia, enquanto que outras apresentaram decréscimo no quinto e sexto.

CAPANZANA e BUCKLE (1997) estudaram a otimização do processo de malteação de grãos de arroz. As condições ótimas de germinação foram: tempo de maceração de 24 h a 25 °C ou 16 h a 35 °C, tempo de germinação de 3 dias a uma temperatura de 30°C.

2.6 Fermentação alcoólica

A classe de microrganismos responsáveis pela fermentação alcoólica é a das leveduras, embora algumas bactérias como no caso de *Zymomonas*

mobilis também tenham esta capacidade (AMUTHA e GUNASEKARAN, 2001, DAVIS *et al*, 2006).

As leveduras são fungos unicelulares geralmente pertencentes às classes dos Ascomicetos. Apresentam forma oval, elíptica ou arredondada. Possuem parede celular rígida, membrana citoplasmática e as mesmas organelas que são geralmente encontradas em eucariotos, tais como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

Para o seu desenvolvimento e sobrevivência, as leveduras necessitam de carbono, principalmente na forma de carboidratos e estes nas formas de monossacarídeos ou dissacarídeos. Quanto ao ambiente, as leveduras se desenvolvem numa faixa ampla de temperatura, sendo que o intervalo ótimo situa-se entre 20° e 30°C. Em relação ao pH, os limites estão entre 2,2 e 8,0. Estes microrganismos também apresentam elevada resistência osmótica (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

Cerca de 500 espécies de leveduras são conhecidas pelo homem. Dentre elas destacam-se como produtoras de etanol, espécies do gênero *Saccharomyces*, *Schizosaccharamyces*, *Pichia* entre outras. As leveduras utilizadas para a fermentação alcoólica devem apresentar alto rendimento e elevada produtividade de etanol, ou seja, rápida conversão de açúcar em álcool, com baixa produção de componentes secundários. A espécie mais importante de levedura alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, que possui um largo espectro de utilização. É empregada na produção de pães, bebidas, etanol, etc. Sua biomassa pode ser recuperada como subproduto de fermentação e transformada em levedura seca, que se constitui em matéria prima para a fabricação de ração animal ou suplemento vitamínico para o homem (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

As leveduras e outros microrganismos fermentam a glicose em etanol e CO₂ e não em lactato. A glicose é convertida a piruvato pela glicólise e o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em um processo de dois passos. No primeiro o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Esta reação é uma descarboxilação simples e não envolve oxidação do piruvato. No segundo passo, através da ação da álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a

etanol, com o NADH, fornecendo poder redutor. A equação geral da fermentação alcoólica é (LEHNINGER, 1995):



A espécie *Saccharomyces uvarum* se distingue essencialmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae* pela capacidade de fermentação da melibiose e rafinose (SILVA, 1989). *Saccharomyces uvarum* tem a capacidade de hidrolisar a melibiose porque sintetiza a enzima melibiase (α -galactosidase) capaz de hidrolisar a ligação α (1-6) entre as unidades dos monossacarídeos, liberando a glicose e galactose. Possui também capacidade de hidrolisar a molécula de rafinose porque possui, além da melibiase, a invertase. A melibiase está ausente em *Saccharomyces cerevisiae*, por isto essa espécie não metaboliza a melibiose e usa um terço da molécula de rafinose. Durante a utilização da rafinose e melibiose a *Saccharomyces uvarum* pode fermentar glicose, galactose, sacarose e maltose, se presentes no meio. Esta cultura pode ou não fermentar trealose ou α -metil-D-glucosídeo, e não fermentam a celobiose, a lactose e o amido solúvel (SILVA, 1989).

Algumas diferenças existentes entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), além do uso da melibiose e da rafinose, são o poder respiratório, o grau de esporulação, a capacidade de fermentar gliceraldeído e a intensidade de produção de H₂S (SILVA, 1989).

Os açúcares fermentáveis por *Saccharomyces cerevisiae* na cervejaria consistem em glicose, frutose, maltose, maltotriose e sacarose (SILVA, 1989).

As leveduras de baixa fermentação são espécies de *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*), que produzem a cerveja americana e a alemã Pilsener do tipo *lager*. Essas cervejas são processadas pela fermentação profunda (baixa), na qual as leveduras se depositam, após a fermentação tumultuosa, no fundo do tanque. Os agentes biológicos de baixa fermentação são considerados como de alta atividade fermentativa e de menor capacidade respiratória que as leveduras de alta fermentação (*S.*

cerevisiae). A levedura de baixa fermentação desenvolve-se em temperaturas de 5° a 15° C (REINOLD, 1997).

S. cerevisiae é considerada levedura de alta fermentação, pois emerge para superfície após a fermentação tumultuosa (ou principal). Essas espécies de leveduras produzem as cervejas inglesas Porter ou Stout do tipo *ale*, que geralmente são produzidas por fermentação superficial (alta). Esse microrganismo se desenvolve em temperaturas entre 12° C e 21° C (EHRHARDT & SASSEN, 1995; REINOLD, 1997).

De acordo com HORNSEY (2003), a superfície celular das leveduras de alta fermentação (*ale*) está coberta por pequenas protuberâncias microfibrilares, que lhes conferem uma aspereza que permite que as células fiquem em suspensão durante a fermentação. A parte da superfície áspera da parede celular possui carga negativa e hidrofobicidade, características de importância para o processo cervejeiro. A carga negativa é atribuída às cadeias de fosfato localizadas na parede externa de manoproteínas; essa carga é importante durante a finalização da cerveja para o engarrafamento, quando os pontos positivamente carregados das moléculas de colágeno (material usado para a clarificação) atraem células de leveduras em suspensão e provocam sedimentação.

Em 1952 Andrews e Gilliland isolaram uma variedade de *Saccharomyces* responsável por superatenuação de cerveja. Eles a denominaram de *S. diastaticus*. Esta fermenta glicose, frutose, galactose, maltose, sacarose e rafinose e também fermenta parcialmente dextrinas de amido. Quando inoculada em cerveja jovem de densidade 1,0146, o limite de atenuação final com *S. cerevisiae* foi 1,0106; com *S. carlsbergensis* esta foi de 1,010 e com *S. diastaticus* esta foi de 1,0042. *S. diastaticus* requer biotina, inositol e pantetonato de cálcio para crescer (REED e PEPPLER 1973).

O quadro 3 apresenta o perfil de açúcares utilizados por algumas leveduras.

Quadro 3: Açúcares comuns metabolizados por leveduras.

	Açúcares fermentados e assimilados							
	G	Ga	Ma	Su	Me	Ra	La	Xi
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	++	++	++	--	1/3+	--	--
<i>Saccharomyces uvarum</i>	++	++	++	++	++	++	--	--
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	++	++	++	++	--	1/3+	--	--

G=glicose, Ga=galactose, Ma= maltose, Su=sacarose, Me=melibiose, Ra=rafinose, La=lactose, Xi=xilose; ++=fermentável e assimilável; -- = não fermentável e não assimilável; 1/3+ = 1/3 da molécula é fermentada, a molécula inteira é utilizada aerobicamente. Fonte: REED e PEPPLER 1973.

Muitas modificações genéticas têm sido estudadas em leveduras com a finalidade de obter mutantes com características especiais, tais como tolerância a altas concentrações de etanol e produção de enzimas amilolíticas. Esta última possibilita a utilização de amido como substrato para a produção de etanol. Estas modificações são obtidas pela inserção na levedura de um gene de algum microrganismo que possua a característica desejada.

As leveduras do gênero *Saccharomyces*, que tradicionalmente são utilizadas na produção de etanol, não possuem a habilidade de hidrolisar amido. Devido este fato, alterações genéticas têm sido feitas nestes microrganismos, com o objetivo de capacitá-los a utilizar este tipo de substrato (LIU *et al*, 2004). Geralmente é inserido nestas leveduras, material genético de outro tipo de microrganismos, como fungos do gênero *Aspergillus*, ou bactérias do gênero *Bacillus* (LIN *et al*, 1998, LATORRE-GARCÍA *et al* 2004). *Saccharomyces diastaticus* é uma variedade de *Saccharomyces* que tem a capacidade de utilizar amido como substrato, por possuir a capacidade de produzir e secretar glicoamilase. Entretanto, este microrganismo não é capaz de se desenvolver em amido nativo ou insolúvel; isto se deve ao fato de que a enzima produzida por este microrganismo não possuir um domínio de ligação ao amido, como o que está presente na

glicoamilase produzida por *Aspergillus niger*, por exemplo (VERMA *et al*, 2000, LATORRE-GARCÍA *et al* 2004).

VERMA *et al* (2000), em trabalho com uma co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces diastaticus*, utilizando amido solúvel como substrato, concluiu que a fermentação direta do amido pode ser efetivamente conduzida pela co-cultura, com eficiência de 93%, comparada a 78% e 85% de eficiências obtidas com estas mesmas leveduras em processos de bioconversão de duas etapas usando amido pré-hidrolisado.

ÜLGEN *et al* (2002), utilizando uma cepa de *S. cerevisiae* YPG/AB a qual expressa α -amilase de *Bacillus subtilis* e glucoamilase de *Aspergillus awamori* obtiveram rendimento de etanol de 47,5 g/L em sistema descontínuo alimentado representando aumento de 200% em relação ao sistema em batelada.

DELGENES *et al* (1996), estudaram a produção de etanol a partir de madeira em condições contínuas e utilizando co-cultura de *S. diastaticus* e *Pichia stipitis* para a hidrólise e fermentação. Comparando com a fermentação do material pré-hidrolisado, concluíram que na taxa de diluição de 0,125 h⁻¹, produziu-se etanol na concentração de 13,5 g/L com rendimento de 0.25 g/g, produtividade volumétrica de 1,6 g/L.h e taxa de conversão de substrato de 100%. No esquema de fermentação separada por *Zymomonas mobilis*, obteve-se uma concentração de etanol de 39 g/L foi a partir de hidrolisados de celulose com rendimento de 0,35 g/g e produtividade de 7,8 g/L.h, enquanto que *Pichia stipitis* cultivada em hidrolisados de hemicelulose produziu etanol (14 g/L) com rendimento de 0,37 g/g e produtividade de 0.56 g/L.h.

SHIGECHI *et al* (2002) avaliaram duas variedades de *Saccharomyces cerevisiae*, uma que co-expressava glicoamilase e α amilase na superfície da célula e outra que apresentava glicoamilase e secretava α amilase no meio. Em sistema de fermentação descontínuo alimentado, essas leveduras recombinantes mostraram maior decomposição do amido e habilidade de produção de etanol, do que células que expressavam apenas glicoamilase, produzindo uma concentração de etanol de 60g/L, após 100 horas de fermentação, aproximadamente, em condições anaeróbicas. A variedade

que expressava apenas glicoamilase apresentou uma produção de etanol de aproximadamente 50g/L em 120 horas. Estes pesquisadores utilizaram amido solúvel de batata como fonte de carbono no meio de fermentação, na concentração inicial de 6%. Após uma decomposição do amido presente o meio foi alimentado com novo meio contendo amido a 105g/L e posteriormente com meio contendo 140g/L de amido.

BRINGHENTI *et al* (2007) obtiveram rendimentos de fermentação de 23% em mostos provenientes da hidrólise de amido residual do processamento de farinha de mandioca aditivado com melação, nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20%.

KNOX *et al* (2004) avaliaram a produção de etanol a partir de amido com três variedades de *S. cerevisiae* transformadas com diferentes combinações de genes de leveduras amilolíticas. A variedade recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* stell7, que expressava o gene LK2 da α amilase de *Lipomyces kononenkoae* e SFG1, que expressa a glicoamilase de *Saccharomycopsis fibuligera* produziu 21 g de etanol por litro com coeficiente de rendimento 0.4 (g de etanol/g de amido) após 120 h em cultivo anaeróbio. Cem por cento de hidrólise do amido foi obtida em 100 horas. O meio inicial continha 55g de amido por litro.

Com o objetivo de reduzir a quantidade de enzima utilizada na produção de álcool e avaliar a composição desse álcool formado, KŁOSOWSKI *et al* (2006) utilizaram um mutante nomeado I-7-43 (mutante entre *S.cerevisiae* e *S. diastaticus* resultante da eletro fusão de protoplasto entre mutantes auxotróficos das variedades originais) em meio contendo amido de milho liquefeito com α amilase e sacarificado com amiloglicosidase numa dose reduzida em 25% em relação ao controle que utilizou a dose integral de amiloglicosidase e *S. cerevisiae*. Estes autores concluíram que a dose de amiloglicosidase pode ser reduzida em 25% do valor recomendado, com a utilização da variedade I-7-43, sem trazer diferenças no rendimento e produtividade da fermentação. Em ambos os casos o rendimento da fermentação foi em torno de 65 dm³ de álcool anidro/100kg de amido com 72 horas de fermentação. A produtividade máxima foi obtida com 24h de fermentação, sendo nos dois casos próximos a 58cm³ de álcool anidro/dm³ de meio h⁻¹. O resíduo de açúcares redutores também foi igual para ambos

os tratamentos, a saber, 0,07% para o controle e 0,08% para a mutante I-7-43. A concentração de compostos carbonila foi 10% maior nos destilados obtidos a partir do mosto fermentado por I-7-43, entretanto a concentração de álcoois superiores foi menor por volta de 15%, em relação ao controle. Isto foi devido a menor porcentagem de isobutanol e álcoois amílicos.

BIROL *et al* (1998) obtiveram rendimento de 43,8g/L de etanol em meio com 10% de amido, utilizando uma variedade geneticamente modificada de *S. cerevisiae* YPG/AB, que expressa separadamente amiloglicosidade de *Aspergillus awamori* e α amilase de *Bacillus subtilis*. A produção de etanol foi observada após aproximadamente 43h de fermentação. A produtividade de etanol desta variedade foi maior quando comparada com a variedade YPB-G, que secreta essa enzimas de forma fundida. A variedade YPG/MM, que expressa α amilase de ratos, não produziu etanol devido a sua deficiência em produzir amiloglicosidase.

BANDARU *et al* (2006), estudando a produção de etanol a partir de amido de sagu liquefeito com α amilase e sacarificado continuamente por sistema de imobilização de amiloglicosidase e fermentado por *Zymomonas mobilis*. Estes pesquisadores utilizaram a técnica de superfície de resposta para determinar as melhores condições do processo. A produção máxima de etanol de 55,3 g/L foi obtida usando a concentração de amido de 150 g/l. As condições ótimas foram a temperatura de 32.4°C, pH de 4.93 e tempo de fermentação de 17,24h.

Em estudo realizado com células co-imobilizadas de *S. diastaticus* e *Zymomonas mobilis* visando a produção de etanol a partir de amido liquefeito de mandioca, AMUTHA e GUANASEKARAM (2001), encontraram produção de 46,7g/L de etanol a partir de meio com 150g/L de amido. Este resultado foi superior ao encontrado no tratamento que utilizou apenas células de *S. diastaticus* imobilizadas, 37,5g/L, e ao que utilizou uma cultura de células livres, que produziu 34,5g/L. Os rendimentos desses processos foram de 0,38g/g para as células co-imobilizadas, 0,31g/g para *S. diastaticus* imobilizadas e 0,33g/g para as células livres. Esses valores representam, respectivamente, 61%, 49% e 45,1% do rendimento teórico. Avaliando um sistema de bateladas repetidas com o intuito de se aumentar a produtividade de etanol e reduzir o tempo de fermentação e de preparo de inóculo, estes

pesquisadores conseguiram um aumento da concentração final de etanol de 46,7g/L para 53,5g/L, em sete sucessivas bateladas, onde o tempo de fermentação foi reduzido de 42 horas a primeira batelada, para 17 horas na quinta batelada. Quando estudando o sistema contínuo a uma taxa de fluxo de 15mL/h, foi obtida produção de 53,5g/L e rendimento de 0,5g/g de álcool.

2.7 Composição do álcool

Durante a fermentação, outros compostos além do etanol são formados. Alguns são originados do metabolismo secundário da levedura e outros são devidos a contaminações dos mostos.

BRINGHENTI e CABELLO (2005) estudando a produção de álcool de resíduo amiláceo observaram a ausência de álcoois superiores, metanol, glicerol e ácidos orgânicos. Dentre os aldeídos identificados estão o furfuraldeído e o formaldeído com concentrações de 0,01 e 0,004mg/mL respectivamente.

KŁOSOWSKI *et al* (2006) obtiveram concentrações de aldeídos totais de 98 a 110 mg/dm³ de álcool anidro (AA), metanol 8mg/100cm³ AA, acetato de etila variando de 126 a 258 mg/dm³ de AA, *n* propanol de 223 a 251 mg/dm³ de AA, isobutilico entre 829mg a 1,311 g/dm³ de AA, *n* butanol entre 4 e 3 mg/dm³ de AA, álcool amílico de 859mg a 1,071 g/dm³ de AA. Estes pesquisadores avaliaram a redução da dose de enzimas utilizadas na hidrólise do amido através da utilização de uma levedura amilolítica.

A Agência Nacional do Petróleo (ANP), na Resolução 36 de 06/12/2005 publicada no Diário Oficial da União de 06/12/2005, estabelece as especificações para álcoois combustíveis, anidro e hidratado. Porém esta não estabelece valores para álcoois superiores, ésteres e outros compostos (BRASIL, 2005). Segundo a resolução ANP nº 5, de 24/2/2005, os aldeídos, ésteres e álcoois superiores devem estar ausentes no álcool anidro combustível, enquanto que no álcool hidratado, devem estar dentro do limite máximo de 60 mg/L, 100mg/L e 500mg/L, respectivamente (BRASIL, 2005).

A Coopersucar admite em seu padrão de qualidade para álcool hidratado, limites para metanol de 30mg/L, acetaldeído de 50mg/L, acetato

de etila de 120 mg/L, N-propanol, 20mg/L, N-butanol, 10mg/L e álcool isoamílico, 200mg/L (COOPERSUCAR, 2007).

A instrução normativa nº. 13, de 29 de junho de 2005, estabelece o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. Esta estabelece que os limites de ésteres, acetaldeído e álcoois superiores devem estar baixo dos limites máximos de 200, 30 e 360 mg/100mL de álcool anidro. Para metanol, o limite máximo deve ficar abaixo de 20mg/100mL AA.

3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AMIDO DE MANDIOCA E DOS MALTES DE CEREAIS

3.1 Introdução

O malte é tradicionalmente utilizado na fabricação de bebidas alcoólicas como no caso da cerveja e whisky (LEWIS e YOUNG, 1995). O extrato de malte também é utilizado como fonte de açúcares para alimentação, principalmente maltose (GOERING *et al*, 1980). O malte é produzido a partir da germinação do cereal em condições definidas de tempo, temperatura, aeração e umidade, de maneira a proporcionar uma maior atividade das amilases e obter as características sensoriais desejadas do malte. (LEWIS e YOUNG, 1994) O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mandioca, devido à boa adaptação dessa cultura aos diversos tipos de solos presentes no território brasileiro, sendo um alimento consumido em todo o país, em diversas formas, principalmente nas regiões norte e nordeste (MATTOS *et al*, 2002, VILPOUX e CEREDA, 2003). O amido ou fécula de mandioca apresenta diversas utilizações entre elas na alimentação, nas indústrias de papel, têxtil, petróleo, entre outras (CEPEA/ESALQ, 2006). As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram caracterizadas com relação à sua composição físico-química. Os maltes foram caracterizados quanto ao teor de açúcares redutores, amido, umidade e pH. A fécula de mandioca foi caracterizada em relação à umidade, pH e teor de amido.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Matérias-primas

a) Amido de mandioca

Utilizou-se fécula de mandioca comercial da marca Amafil adquirido no comércio local.

b) Maltes de cereais

Foram utilizados maltes de quatro tipos de cereais. Os maltes de cevada, trigo e centeio foram adquiridos da empresa Agrária, localizada na cidade de Guarapuava no estado do Paraná, em uma embalagem de 50 kg para o malte de cevada de uma de 25kg para o de centeio e uma de 25kg para o malte de trigo. Como não foi identificado um fornecedor de malte de milho e por ser este um dos maltes mais convenientes para a produção de açúcares no Brasil devido os custos e disponibilidade deste cereal, optou-se por produzi-lo em laboratório de forma que este fosse também testado nos experimentos.

Os diferentes tipos de malte foram triturados a seco em moinho de discos elétrico de bancada marca Arbel modelo MCF-55, com a finalidade de se obter uma farinha fina. Estes foram acondicionados em potes plásticos devidamente higienizados e armazenados em geladeira na temperatura de 10°C até o momento de uso.

c) Preparo do malte de milho

O malte de milho foi produzido no Laboratório de Secagem de Grãos do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. A metodologia de malteação utilizada na produção foi a descrita por LEWIS e YOUNG (1994). Os grãos de milho do cultivar UFV M100 cultivados no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, foram selecionados e lavados com água para retirada de sujidades. Em seguida foram umedecidos, sob temperatura de 15°C por 3 dias, até

atingirem 40% à 45% de umidade. A água de maceração foi periodicamente trocada para evitar acúmulo de substâncias solúveis do cereal. Após atingirem a umidade desejada, as sementes foram dispostas em bandejas na câmara de germinação a temperatura controlada de 20°C. O tempo de germinação foi de 4 dias, de acordo com as recomendações de BIAZUS *et al* (2005), para proporcionar uma maior atividade das amilases do milho. Após a germinação as radículas e epicólitos foram retirados com o auxílio de uma faca de mesa. A secagem foi feita em estufa na temperatura de 54°C por 4 horas até atingirem 60% do peso dos grãos úmidos.

3.2.2 Metodologias

a) Determinação do teor de açúcares redutores gerados pelo próprio malte sem adição de fécula.

Durante a hidrólise da fécula pelas enzimas dos maltes utilizados, o amido do próprio malte também sofre a ação destas enzimas. Por esta razão, foi necessário quantificar estes açúcares formados.

Foi preparada uma suspensão de 100g contendo aproximadamente cinco gramas do malte moído e água destilada. Em seguida mantidas as mesmas condições que seriam utilizadas nas hidrólises, 50°C durante 24h sob constante agitação. Ao final deste período a água removida por evaporação foi repostada e foi determinada a porcentagem de açúcares redutores destas suspensões em função da massa de malte utilizada.

b) Determinação de açúcares redutores

Este método foi utilizado com o objetivo de determinar os açúcares redutores presentes ou formados em três situações: nas matérias-primas utilizadas, os formados durante etapas de hidrólise e presentes nos meios de fermentação.

Os açúcares redutores foram determinados pelo método Lane-Eynon, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005). O método tem como base a redução de íons de cobre da solução de Fehling

pela ação da extremidade redutora de alguns açúcares, com o uso de altas temperaturas e meio alcalino. As amostras sólidas foram submetidas a três extrações com água a 10°C e centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado na análise.

Em um Erlenmeyer juntou-se 10mL de cada uma das soluções de Fehling, devidamente fatoradas com solução de glicose 1%, adicionou-se 40mL de água destilada e levou-se à ebulição. Em seguida titulou-se com as soluções das amostras até a formação de um precipitado de cor avermelhada no fundo do recipiente. O teor de açúcares redutores foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{Açúcares redutores} = \frac{100Vf}{mv}$$

Em que:

V=volume da solução da amostra, em mL;

f= fator das soluções de Fehling;

m= massa da amostra, em gramas;

v=volume de solução de amostra gasto na titulação, em mL;

c) Determinação do teor de amido

O método utilizado foi o descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005), e tem como base a hidrólise do amido presente na amostra pela ação de base e ácido para formação de açúcares redutores. Posteriormente à hidrólise, os açúcares formados são determinados pelo método de Lane-Eynon. O teor de amido é calculado pela equação abaixo.

$$\% \text{ Amido} = \frac{100Vf}{mv} 0,9$$

Onde: V=volume da solução da amostra;

f= fator das soluções de Fehling;

m= massa da amostra;

v=volume da solução da amostra gasto na titulação;

0,9= fator de transformação de açúcares redutores em amido;

d) Determinação de umidade

Pesou-se as placas de Petri devidamente limpas e secas, em seguida adicionou-se aproximadamente 5 gramas da amostra. Esta foi levada à estufa a 105°C por 24h. Após este período, as amostras foram retiradas e colocadas em dessecador e pesadas até atingir peso constante (Instituto Adolfo Lutz, BRASIL, 2005). A determinação da umidade foi feita por diferença de peso entre a amostra úmida e a amostra seca.

e) Determinação do pH

Foi feita utilizando de pHmetro digital da marca WTW, modelo pH330i de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005). Para medição em amostras sólidas, estas foram diluídas em água recentemente fervida e resfriada, para retirada de gases dissolvidos.

f) Preparo do extrato enzimático dos maltes

Utilizou-se metodologia descrita por SANTOS (1999) para extrair as amilases da matéria sólida, viabilizando a análise. Cinco gramas de malte, finamente triturados, foram dissolvidos em 100 ml de cloreto de sódio 0,5%, permanecendo por 1 hora a 30 °C, sob constante agitação. Em seguida, foram centrifugados (3400 x g por 10 minutos) em centrífuga da marca Fanem modelo Excelsa II 206BL e filtrados em papel-filtro Whatman 125 mm. Dez mililitros do filtrado, diluídos em 100 mL de cloreto de sódio 0,5%. Logo após a extração foi feita a determinação da atividade amilolítica. Este extrato foi também usado para determinação da proteína total pelo método de LOWRY (1951).

g) Atividade amilolítica dos extratos enzimáticos dos maltes

A avaliação da atividade das amilases dos maltes foi feita utilizando do kit comercial Bioclin K003 Amilase colorimétrica. Seguindo a metodologia descrita por CARAWAY (1959) modificada. A determinação da atividade de

amilase tem como base a hidrólise do amido pela amilase, com liberação de moléculas de glicose e dextrina. O amido não hidrolisado adquire coloração azul, depois de reagir com a solução de iodo adicionada. Essa coloração é inversamente proporcional à atividade da amilase, e esta é calculada pela comparação com um controle de substrato sem adição da enzima. A medição da cor é feita em espectrofotômetro a 660 nm, comprimento de onda este em que é apresentada a maior estabilidade (CARAWAY, 1959).

Nos tubos previamente identificados (controle e amostras), foram adicionados 0,5 mL do reagente nº 1 (amido solúvel). Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C, por dois minutos. Uma alíquota de 10 µL do extrato enzimático de cada malte foi adicionada a cada um dos tubos, sendo que no tubo controle apenas os reagentes foram adicionados. Os tubos foram agitados e levados a banho-maria a 37°C, durante sete minutos e trinta segundos. Ao fim deste tempo foram adicionados a cada tubo 0,5 mL reagente de trabalho (solução de Iodo) e 4 mL de água destilada. Após agitação, as absorbâncias das amostras e do controle foram determinadas a 660 nm, em espectrofotômetro Thermospectronic, previamente zerado com água destilada. A atividade das amilases dos maltes foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades de amilase (UA/dL)} = \frac{C-A}{C} 800$$

Em que:

C: Absorbância do controle

A: Absorbância da amostra

Uma unidade da amilase representa a quantidade da enzima que hidrolisa totalmente 10 mg de amido, em 30 minutos a 37°C.

h) Determinação do teor de proteína nos extratos de malte

O mesmo extrato enzimático utilizado na determinação da atividade amilolítica foi utilizado na determinação de proteína pelo método de Lowry, (1951). O princípio do método baseia-se numa reação de oxiredução de

molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Foram preparados os reagentes A e B. O reagente A foi preparado a partir de 0,5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1g de citrato de sódio adicionando-se 100mL de água destilada. Para preparo do reagente B, juntou-se 20g de Na_2CO_3 , 4g de NaOH em 1 litro de água destilada.

No momento da análise, foi preparado o reagente C, pela adição de 50mL do reagente B e 1mL do reagente A.

Em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL do extrato enzimático adicionou-se 2,5 mL do reagente C, lentamente e a temperatura ambiente. Misturou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, misturando, e deixando reagir por 30 minutos. Após este tempo, foi feita a leitura em 735nm. Albumina sérica bovina (BSA), adquirida de Sigma Chemical, foi usada na construção da curva padrão. O resultado das análises de atividade amilolítica dos extratos foi dividido pelo teor de proteínas das respectivas amostras, obtendo-se assim a atividade específica aparente das enzimas.

3.3 Delineamento experimental

Os experimentos para determinação da atividade enzimática em função do tipo de malte foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Análise físico-químicas dos maltes de cereais e da fécula de mandioca

Os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos estudados nos maltes estão apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Resultados das análises físico-químicas dos maltes utilizados.

Malte	Açúcares Redutores (%)	Amido (%)	pH	Umidade (% base úmida)	Açúcares gerados (%)
Trigo	8,95	49,39	5,99	9,39	31,61
Milho	9,89	49,59	5,68	13,22	24,29
Cevada	14,09	42,90	5,64	10,92	35,74
Centeio	8,44	42,80	6,01	9,60	29,95

A alta umidade das amostras pode ser devida a absorção de água durante o armazenamento. A umidade ideal para maltes deve estar em torno de 4% (LEWIS e YOUNG, 1995).

Os teores de açúcares redutores relativamente altos e os de amido relativamente baixos se devem à conversão do amido em açúcares durante o processo de malteação e alguma ação hidrolítica após esta etapa.

SUHASINI *et al* (1997) estudando duas variedades de trigo, uma adequada e outra não adequada para malteação, os teores de açúcares totais, sacarose e maltose aumentaram em sete, quatro e seis vezes, respectivamente, após 120h de germinação para duas variedades. Os teores de açúcares totais foram de 1,32% e 0,92% antes da germinação e 8,7% e 6,32% após as 120h para a adequada e a não adequada, respectivamente.

NIRMALA *et al* (2000), estudando a malteação de *ragi*, uma espécie de milheto usada na Índia, relataram que conteúdo de açúcares redutores totais aumentou de 1.44 para 8.36%, após 96 h de germinação e que houve um decréscimo linear no conteúdo de amido de 65% para 43%.

O malte de cevada apresentou maior formação de açúcares redutores, seguido por trigo, centeio e milho. Estes valores de açúcares redutores serão levados em conta no momento da determinação da eficiência de hidrólise do amido de mandioca, de maneira que não venham a superestimar os resultados.

Os resultados das análises da fécula estão expostos na tabela 3.2 abaixo. Os resultados abaixo são medias de três repetições.

Tabela 3.2: Resultados das análises da fécula de mandioca.

Parâmetro	Valores
Umidade	11,8 (%)
pH	5,2
Teor de amido	89,0 (%)

Na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, a umidade da fécula de mandioca é de 17,8 % e o teor de carboidratos totais de 81,1% em base úmida (NEPA-UNICAMP, 2006). A menor umidade da fécula utilizada neste trabalho pode explicar o maior valor percentual para o teor de amido. O teor de umidade está dentro do limite máximo estabelecido na legislação vigente no Brasil, que é de 13,0 % , e o teor de amido esta acima do limite mínimo que é de 80,0 % e o pH esta dentro da faixa estabelecida pelo Concex, de 4,5 a 6,5 (FRANCO *et al*, 2002).

3.4.2 Atividade amilolítica dos maltes

Com o objetivo de se estimar a influência do tipo de cereal e suas respectivas enzimas amilolíticas na hidrólise da fécula de mandioca, foi feita a análise da atividade amilolítica dos maltes. Os resultados estão apresentados na tabela 3.3 abaixo.

Tabela 3.3: Atividade das amilases dos maltes de cereais. Os valores são relativos à amostra de 10 μ L do extrato enzimático.

	Proteína (mg)	Unidade de amilase(UA)	Atividade específica aparente (UA/mg de proteína)
Cevada	2,14	117,7	54,9 (\pm 11,69) a
Trigo	2,10	95,5	45,4 (\pm 4,26) a
Milho	1,58	20,9	13,3 (\pm 8,19) b
Centeio	2,61	33,3	12,7 (\pm 5,31) b

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Como pode ser observado na tabela 3.3, os maltes de cevada e trigo apresentaram maior atividade amilolítica específica, sendo estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade 5% e maiores que centeio e milho.

Diferenças na atividade amilolítica dos maltes estão relacionadas com fatores como qualidade dos grãos e processo de malteação. Segundo BIAZUS *et al* (2005), estudando a otimização das etapas de produção de malte de milho, o quarto dia seria ideal para interrupção da germinação, pois neste estágio, os grãos milho germinados apresentaram um pico de atividade enzimática. Segundo os mesmos autores, a secagem das sementes deve ser feita a uma temperatura de 54°C por um tempo de 5 horas e 10 minutos a 6 horas para preservação maior das enzimas. BIAZUS *et al* (2006), afirmam que o pH ideal para a ação das amilases do milho está na faixa de 4,3 a 6. Os autores afirmam também que, a temperatura de 90°C, as amilases do milho apresentaram pico de atividade, provavelmente por ser esta a faixa ideal para ação da α amilase do milho. A 50°C ocorreu também a elevação da atividade enzimática, indicando que esta seria a temperatura de ação ideal da β amilase do milho.

GEORG-KRAEMER *et al* (2001), estudando a germinação de 10 cultivares de cevada, notaram que todas as amostras revelaram aumento na atividade da amilase até o terceiro ou quarto dia de germinação. A alta atividade da β -amilase foi observada já no segundo dia de germinação, enquanto que a atividade da α amilase começou a aumentar somente a partir do terceiro dia.

DEWAR *et al* (1997) afirma que a qualidade do malte de sorgo aumentou com o tempo de umedecimento entre 16 a 40 h. O poder diastático do malte aumentou com a temperatura de malteação acima de 30°C.

ENEJE *et al* (2004) afirmam que os maiores níveis de atividade amilolítica estiveram associados com menores conteúdos de nitrogênio das amostras de milho germinado. Os autores concluíram que a duração do umedecimento e da germinação dos grãos de milho foi importante no desenvolvimento das enzimas.

3.5 Conclusão

O reduzido teor de amido e o relativamente alto teor de açúcares nos maltes são devidos à ação das amilases sobre o endosperma dos grãos durante o processo de germinação. O teor de amido e umidade da fécula estão de acordo com os limites da legislação brasileira. O pH da fécula se encontra no valor ideal para a ação das amilases. Após a hidrólise do amido de mandioca pelas enzimas dos maltes, os açúcares resultantes da hidrólise do amido dos maltes bem como o amido residual dos maltes estarão presentes nos hidrolisados, portanto quantificação destes compostos se faz necessária para se fazer as devidas correções nas avaliações de rendimento de hidrólise.

Os maltes de cevada e trigo apresentaram maior atividade amilolítica específica aparente. Este resultado é justificado pela maior atividade das suas enzimas, resultado do aprimoramento das técnicas de malteação e secagem, que garantem uma maior qualidade das enzimas. O malte de milho e o de centeio foram os que apresentaram menor atividade amilolítica. Com relação ao malte de milho, isto pode ser devido ao fato de este ter sido produzido em laboratório e possivelmente sem os mesmos controles dos processos industriais. Mais pesquisas são necessárias para o estabelecimento de técnicas de malteação que proporcionem uma maior atividade das enzimas do milho. Algumas vantagens da utilização do malte de milho serão avaliadas no próximo capítulo.

4. HIDRÓLISE DO AMIDO DE MANDIOCA PELAS ENZIMAS DOS MALTES DE CEVADA, TRIGO, MILHO E CENTEIO EM TRÊS CONCENTRAÇÕES

4.1 Introdução

A cana-de-açúcar é, sem dúvida nenhuma, a melhor matéria-prima para obtenção de etanol no Brasil, tanto técnica como economicamente. Entretanto, outras regiões onde o clima e solo não são favoráveis à cana, o preço e disponibilidade deste combustível são afetados. Uma alternativa para solucionar este problema seria a produção de álcool a parte de matérias amiláceas, como a mandioca.

O amido é composto principalmente por uma porção linear, a amilose, um polímero linear de glicose, conectadas por ligações α (1-4) e uma ramificada, a amilopectina, que tem uma estrutura altamente ramificada, constituída por cadeias de amilose conectadas entre si por ligações α (1-6) (SURMELY *et al*, 2003). Quando hidrolisado, o amido da origem a açúcares fermentescíveis que podem servir como substrato para produção de álcool.

O arranjo da amilose e da amilopectina nos grânulos leva à formação de zonas de deposição mais ou menos densas. A região onde se concentra a amilopectina é mais densa e cristalina. Sendo mais compacta, dificulta a entrada de moléculas como as de água e enzimas, apresentando-se portanto mais resistente ao processo de hidrólise (FRANCO *et al*, 2002).

Geralmente as enzimas utilizadas na hidrólise do amido são produzidas por vegetais, como no caso do malte, ou microrganismos amilolíticos, como algumas espécies de fungos e bactérias e em processos de fermentação submersa. Normalmente estas últimas são importadas e caras (SPIER, 2005).

WOICIECHOWSKI *et al* (2002), afirma que a hidrólise ácida de 150kg de bagaço de mandioca para produção de açúcares redutores apresentou custos de US\$ 34.27, enquanto que o processo enzimático, para a mesma quantidade custaria US\$ 2470.99, sendo que o elevado custo da hidrólise enzimática se deu devido ao elevado tempo de hidrólise e ao alto custo das enzimas.

LEONEL e CEREDA, (1998), utilizando farelo de mandioca, um subproduto da produção da fécula, como matéria-prima e enzimas comerciais na hidrólise, obtiveram um custo de produção de R\$ 0,90 por litro de álcool. Porém as enzimas representaram 53% dos custos.

Este fato, aliado à baixa produtividade da mandioca no Brasil torna o processo de obtenção de álcool de mandioca mais caro quando comparado ao álcool de cana (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003).

A busca por novas fontes de enzimas e de processos que reduzam os custos da produção de álcool de amiláceos tem recebido considerável atenção entre os pesquisadores (SPIER 2005, SANTANA, 2003).

A α amilase (EC 3.2.1.1; α -1,4 glicano 4-glicanohidrolase) e a β amilase (EC 3.2.1.1, α -1,4 glicano-maltohidrolase) são enzimas presentes nos maltes de cereais obtidos a partir de cereais germinados. Estas enzimas degradam as ligações α (1-4) da amilose e amilopectina, não agindo sobre as ligações α (1-6) das ramificações da amilopectina (WHITAKER, 1994, BOYER, 1971).

As enzimas do malte já foram utilizadas anteriormente na hidrólise de amido visando a produção de álcool (ARAÚJO, 1982), mas esta idéia não foi muito aplicada e estudada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação das enzimas dos maltes de quatro tipos de cereais na hidrólise de amido de mandioca, por estas possuírem menores custos quando comparadas às enzimas purificadas de origem microbiana, e assim determinar qual cereal seria mais adequado para a utilização como fonte de enzimas para a produção de álcool de mandioca.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

a) Amido de mandioca

Neste trabalho foi utilizada fécula de mandioca comercial da marca Amafil adquirida no comércio local. A fécula apresentou teor de amido de 89%, umidade de 11,8% e pH de 5,2.

b) Maltes de cereais

Foram utilizados maltes de cevada, trigo, milho e centeio, como descrito no item 3.2.1.

4.2.2 Metodologia

a) Hidrólise das suspensões de fécula de mandioca

Testou-se a capacidade hidrolítica dos maltes de cereais sobre o amido de mandioca conforme se segue:

A massa de fécula foi pesada e suspensa em água destilada formando uma suspensão de massa 100g contendo 12% de fécula em peso. Não foi necessário ajustar o pH da suspensão pois este já se encontrava dentro do intervalo ideal para a ação das amilases. A massa do béquer e a massa total da suspensão composta de amido, água e malte foram tomadas com a finalidade de repor a água perdida durante a gelatinização e hidrólise.

Em um béquer de 200 mL, as suspensões de 100g contendo 12% de fécula foram aquecidas em temperatura superior a 60°C em manta aquecedora sob agitação constante para gelatinização do amido com o objetivo de facilitar a ação das enzimas. A pasta de amido foi resfriada até 50° C a 55° C e adicionado o malte na concentração testada, homogeneizando para uma boa interação do substrato com a enzima. As amostras foram incubadas a temperatura de 50°C durante 24h com agitação

periódica para melhor ação das enzimas. Após este período a suspensão foi filtrada em malha sintética para separar-se o hidrolisado da parte fibrosa (cascas de malte e amido não hidrolisado). Foram testadas 3 concentrações de malte (0,5 g/100g, 1,0 g/100g e 1,5g/100g de suspensão, correspondentes a 4,0%, 8,0% e 12,5% em relação à massa de amido e a hidrólise usando enzimas comerciais com o objetivo de avaliar qual das concentrações fornece uma maior eficiência de hidrólise.

b) Análise do hidrolisado

Os hidrolisados obtidos foram analisados com relação ao perfil dos açúcares formados, glicose e maltose, e da quantidade de amido residual por meio de kits enzimáticos da Boehringer.

As amostras de hidrolisados foram diluídos nas proporções de 1:500 para análise de maltose, 1:100 para análise de glicose e 1:1000 para amido, de maneira que as leituras de absorbâncias estivessem dentro do limite de linearidade do aparelho, de acordo com as recomendações descritas no manual de utilização dos kits Boehringer,

4.3 Delineamento experimental

O experimento foi realizado num delineamento inteiramente casualizado disposto em arranjo tipo fatorial 4 x 3, com os fatores tipo de malte em quatro níveis (milho, cevada, centeio e trigo) e concentração do malte, com três níveis (4,0%, 8,0% e 12,5% em relação a massa de amido). O experimento foi feito em três repetições. Foi calculada a eficiência das hidrólises e os dados foram analisados por meio de análise de variância e em seguida foram feitas as análises de regressão testando o ajuste do modelo do tipo linear, com o objetivo de descrever a variação da eficiência da hidrólise em função dos tipos de malte e da concentração utilizadas. Os dados foram analisados com o auxílio do programa SAS (*Statistical Analysis System*), licenciado para Universidade Federal de Viçosa.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Açúcares formados durante a hidrólise

A tabela 4.1 mostra o perfil dos açúcares formados na hidrólise do amido de mandioca pelas enzimas dos maltes de cereais.

Tabela 4.1: Açúcares formados pela hidrólise do amido pelas enzimas dos maltes.

	Concentração (%)	Maltose (g/L)	Glicose (g/L)	Açúcar Total (g/L)	Açúcares redutores do malte (g/L)	Açúcares redutores da Fécula (g/L)
Cevada	4,0	87,38	2,87	90,25	1,79	88,47
	8,0	100,64	4,34	104,99	3,58	101,42
	12,5	110,21	5,18	115,39	5,36	110,04
Trigo	4,0	90,80	2,01	92,81	1,58	91,23
	8,0	96,13	4,23	100,36	3,16	97,20
	12,5	98,59	4,77	103,37	4,74	98,63
Centeio	4,0	86,83	2,47	89,30	1,50	87,81
	8,0	89,29	5,72	95,02	3,00	92,03
	12,5	95,44	5,49	100,94	4,49	96,45
Milho	4,0	67,55	6,21	73,77	1,22	72,56
	8,0	84,37	10,79	95,16	2,43	92,74
	12,5	98,04	12,52	110,56	3,64	106,93

Conforme mostra a tabela 4.1, as concentrações de maltose e açúcares totais não tiveram variações expressivas nos hidrolisados obtidos através dos maltes de trigo e centeio. Os teores de glicose foram, em todos os casos, muito menores que os teores observados para maltose. Isto é devido provavelmente a uma maior atividade das β -amilases em relação à α -amilases.

Os teores α -amilases de presentes nos cereais *in natura* são nulos ou muito menores que os das β -amilases, mas estes rapidamente aumentam com a germinação dos grãos.

GEORG-KRAEMER *et al* (2001), afirmam que a atividade da β amilase durante a germinação de 10 cultivares de cevada brasileira foi sempre superior que a da α -amilase. Relatam também que a atividade da β amilase foi altamente correlacionada com o poder diastático do malte, indicando que a atividade da β amilase pode ser um melhor parâmetro de avaliação da qualidade do malte. EVANS *et al* (1997) também afirmam quem o poder diastático está altamente correlacionado à atividade da β -amilase.

As β -amilases hidrolisam as ligações glicosídicas da molécula de amido a cada duas moléculas de glicose, formando maltose. Nas extremidades das cadeias, caso haja três unidades de glicose, elas deixam estes resíduos de três unidades, formando maltotriose. A glicose formada se deve quase inteiramente a ação das α -amilases, que atacam aleatoriamente a molécula de amido gerando dextrinas e pequena quantidade de glicose (SANTANA, 2003, LEWIS e YOUNG, 1995, KENT, 1975).

A α -amilase de *B. subtilis* e *B. amyloliquefacience* hidrolizaram amilose a uma mistura de resíduos contendo G1 a G6 (moléculas de uma a seis umidades de glicose), gerando preferencialmente G2, G3 e G6, e liberou G1 a partir de G7, atacando pela extremidade redutora, e tendo uma fraca ação sobre G6 e quase nenhuma ação sobre G5. O limite de hidrólise do amido foi de aproximadamente 35% (HIZUKURI, 1996). A maior afinidade por moléculas maiores explicaria a diminuição da atividade das α -amilases e a menor produção de glicose.

Os produtos da hidrólise das α -amilases são oligossacarídeos de comprimento de cadeia variáveis, os quais possuem α -configuração no carbono C1 da unidade redutora de glicose, daí vem o nome α -amilase (Hill & Macgregor citados por MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005). Por esta razão a α -amilase pode gerar resíduos de glicose.

A tabela 4.2 a seguir mostra a composição percentual dos açúcares do hidrolisado para cada tipo de malte na concentração 12,5%.

Tabela 4.2. Composição percentual dos açúcares dos hidrolisados obtidos pela ação das enzimas dos maltes na concentração de 12,5%.

Malte	Maltose (%)	Glicose (%)
Cevada	95,48 (a)	4,51 (a)
Trigo	95,37 (a)	4,62 (a)
Centeio	94,64 (a)	5,35 (a)
Milho	88,7 (b)	11,30 (b)

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

NEVES (2004), estudando a produção de álcool a partir de crueira de mandioca, um resíduo da produção de farinha, promoveu a hidrólise utilizando α amilase Termamyl 120L e amiloglicosidase AMG 300 L ambas da Novozymes. O hidrolisado obtido apresentou 97,49% de glicose, 1,35% de maltose e 1,16% de dextrinas. A maior quantidade de glicose é devida ao uso da amiloglicosidase, que é capaz de quebrar as ligações α (1-6) e α (1-4), gerando grandes quantidades de glicose.

EJIOFOR *et al* (1995) obtiveram por aproximadamente de 80.7% de glicose no hidrolisado do amido proveniente de águas residuais do processamento de mandioca, utilizando enzimas microbianas α amilase e glucoamilase. O restante dos açúcares compreendia malto-oligossacarídeos, principalmente maltose e isomaltose.

4.4.2 Rendimentos e eficiências das hidrólises

O rendimento teórico da hidrólise do amido foi obtido pela seguinte equação de acordo com FERREIRA *et al* (2006):

$$Y_{\text{TEÓRICO}} \text{ (g/L)} = \frac{\frac{180}{162} \text{ Massa de Amido}}{\text{Volume da Suspensão}}$$

Em que: 180 é a massa molecular da glicose e 162 é massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido;

A partir dos valores de rendimento foi calculada a eficiência da hidrólise pela seguinte equação:

$$\text{Eficiência da Hidrólise (\%)} = \frac{Y_{\text{REAL}}}{Y_{\text{TEÓRICO}}} \cdot 100$$

Em que: Y_{Real} é o rendimento de açúcares obtido na suspensão (g/L) e $Y_{\text{Teórico}}$ é o rendimento que seria obtido da hidrólise total da massa de amido (g/L).

Considerando que a fécula usada como matéria prima apresentava 90% de amido, uma suspensão de 120g/L de fécula, contendo aproximadamente 108g de amido, produzirá 120 gramas por litro de açúcares redutores. Este valor é o rendimento teórico de hidrólise.

A tabela 4.3 apresenta os resultados do rendimento obtido e da eficiência de hidrólise dos tratamentos.

Tabela 4.3: Rendimento e eficiência de hidrólise dos maltes utilizados.

	Concentração	Yreal	Eficiência
Malte	(%)	(g/L)	(%)
	4,0	88,47	74,29
Cevada	8,0	101,42	85,17
	12,5	110,04	93,18
	4,0	91,23	76,61
Trigo	8,0	97,20	82,31
	12,5	98,63	82,83
	4,0	87,81	73,67
Centeio	8,0	92,03	77,24
	12,5	96,45	81,01
	4,0	72,55	60,88
Milho	8,0	92,74	78,53
	12,5	106,92	89,76

Como mostra a tabela 4.3, as maiores concentrações (12,5%) foram as que forneceram maiores rendimentos de hidrólise para todos os maltes, sendo que a cevada obteve uma maior eficiência (93,18% em média) seguida pelo milho, trigo e centeio, com 89,76%, 82,83% e 81,01% respectivamente. Pode-se notar também que o aumento da porcentagem de malte adicionado não representou aumentos relevantes no rendimento de hidrólise nos maltes de trigo e centeio. Já para os maltes de cevada e milho, este aumento foi bastante considerável.

Apesar de apresentar menor atividade amilolítica, o malte de milho apresentou resultados próximos aos da cevada quando usado na maior concentração. Isso talvez seja devido a uma maior afinidade das enzimas do milho pelo amido de mandioca, em relação às demais enzimas. Segundo BOYER (1971), diferenças na composição dos aminoácidos que compõem as amilases refletem em suas propriedades físicas, químicas e enzimológicas. Amido de batata é digerido mais rapidamente por amilases de soro, urina e saliva do que amido de milho, enquanto que este é mais susceptível a ação de amilase pancreática e duodenal. Diferenças na especificidade de uma α amilase, isto é, na maneira detalhada como ela hidrolisa um polissacarídeo, pode ser explicada em termos de seus subsítios no sítio ativo da molécula (MURALIKRISHNA e NIRMALA, 2005).

Este resultado é muito interessante porque o milho é um cereal de custo de produção muito baixo se comparado com a cevada, por exemplo. Com melhorias no processo de malteação, de maneira que se obtivesse um malte de maior atividade enzimática, este poderia ser utilizado para produção de enzimas destinadas a hidrólise de amido de mandioca.

Esses resultados são próximos aos relatados por HOSEIN e MELLOWES (1989), que obtiveram conversão de amido em açúcares de 88 a 92% utilizando enzimas do malte em batata doce e *eddoes*, uma raiz usada na culinária indiana, chinesa e caribenha. A porcentagem de malte ideal para a conversão encontrada pelos autores foi de 8% a 10% para batata doce e de 8% para *eddoes*.

Os resultados acima também são superiores aos obtidos por FERREIRA *et al* (2005) na produção de aguardente de mandioca, onde

foram obtidos 17% de conversão do amido em açúcares redutores utilizando malte de milho, na proporção de 5g/L, a 65°C e pH 6,0.

De acordo com a análise de variância, a interação tipo de Malte*Concentração foi significativa, ou seja, o rendimento de hidrólise não depende de um fator independente, mas sim da combinação entre eles. Isso quer dizer que o efeito da concentração depende do tipo de malte. Para se decompor a interação foi feita uma regressão, testando o modelo linear para as concentrações usadas dentro de cada tipo de malte.

A figura 4.1 mostra o resultado da hidrólise do amido de mandioca pelas diferentes concentrações das enzimas dos maltes testados.

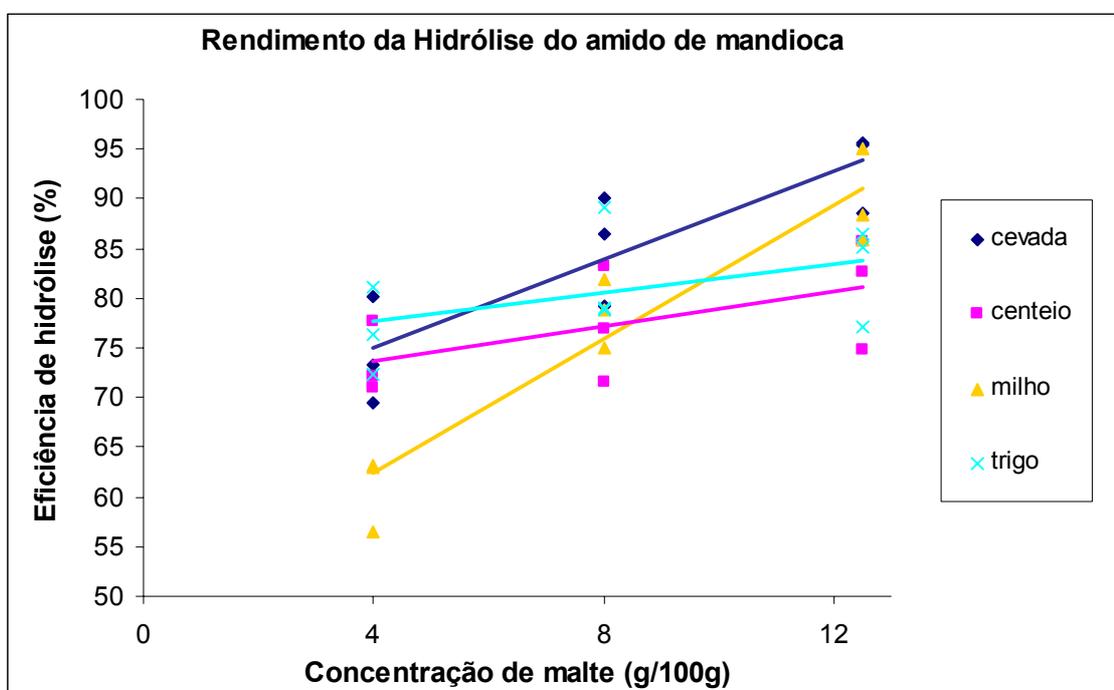


Figura 4.1: Efeito da concentração e do tipo de malte na eficiência de hidrólise do amido de mandioca.

A figura 4.1 mostra que para os maltes de milho e cevada, o aumento na concentração de malte resultou em aumento linear mais pronunciado no rendimento de hidrólise, enquanto que para trigo e centeio, esta relação não foi tão evidente.

Utilizando o Procedimento GLM, foi aplicado o teste F para cada tipo de malte, avaliando o efeito da concentração no rendimento de hidrólise. De acordo com o teste F a falta de ajuste dos modelos foi não significativa para

centeio ($p = 0,9797$), cevada ($p = 0,6993$), milho ($p = 0,3046$) e trigo ($p = 0,5032$) a um nível de significância $\alpha=10\%$. Isto indica que os modelos do tipo linear podem ser adequados para se explicar a influência da concentração no rendimento de hidrólise. De acordo com as análises estatísticas, as regressões dos modelos lineares testados foram significativos para milho ($p < 0,0001$), cevada ($p = 0,0017$) e centeio ($p = 0,0971$) para um nível de significância $\alpha=10\%$. Porém, o modelo testado não foi significativo para o trigo ($p = 0,1685$), para o mesmo nível de significância. Isto quer dizer que, para o trigo, um aumento na concentração de malte não resulta em um aumento significativo no rendimento de hidrólise. A tabela 4.4 apresenta os modelos que melhor se ajustaram para cada tipo de malte.

Tabela 4.4: Modelos lineares ajustados para a eficiência de hidrólise da fécula de mandioca em função da concentração de malte.

Malte	Modelo linear	R ²
Milho	$y = 3,3788x + 48,797$ (*)	0,9042
Cevada	$y = 21,076x + 72,436$ (*)	0,7711
Centeio	$y = 0,8633x + 70,258$ (*)	0,3437
Trigo	$y = 0,7192x + 74,714$ (n.s)	0,2435

(*) = significativo para $\alpha = 5\%$ pelo teste t;

(n.s) = Não significativo para $\alpha = 5\%$ pelo teste t.

Pode-se afirmar que os maiores rendimentos de hidrólise foram obtidos nas maiores concentrações de malte, ou seja, na concentração de 12,5% de malte em relação à massa de amido. Para cevada, rendimento médio foi de 93,18%, enquanto que para milho, trigo e centeio foram de 82,83%, 89,75% e 81,01%, respectivamente.

Estes resultados estão próximos ao encontrados por LEONEL e CEREDA (1999), que obtiveram rendimento de até 97% na hidrólise de uma suspensão de farelo de mandioca com 6% de amido, utilizando celulase e pectinase como enzimas complementares a ação das amilases. Em outro tratamento onde foi utilizado o dobro da concentração de amido, obteve-se rendimento de 87%. São também superiores ao encontrados por LEONEL e

CEREDA (1998) que afirmam que no processo de hidrólise de farelo de mandioca ocorreu conversão de 86,31% do amido inicial e rendimento de 80% de açúcares totais (% do teórico) utilizando pectinase como enzima complementar as amilases.

EDUARDO (2002) estudando a produção de xarope de maltose a partir de mandioca e puba, através da hidrólise com dois diferentes tipos de α amilase, obteve 59,1% de eficiência de hidrólise da mandioca utilizando uma concentração de sólidos de 10%. Quando utilizando puba de mandioca, o maior rendimento foi de 52,1%, em uma concentração de 20% de sólidos.

Já EJIOFOR *et al* (1995), em trabalho visando o cultivo de fermento de panificação em mosto obtido da hidrólise de amido proveniente de águas residuais do processamento de mandioca, afirmam que mais de 98% do amido foi hidrolisado pela ação da α amilase de *Bacillus licheniformes* e de uma glucoamilase de *Aspergillus niger*.

Entretanto estes resultados estão abaixo daqueles apresentados por SRINORAKUTARA *et al* (2004) que encontraram rendimento de 122,4 g/L de açúcares redutores, obtidos através da hidrólise de resíduo de amido de mandioca, com teor de carboidratos não solúveis de 110 g/L. A hidrólise foi conduzida utilizando as enzimas celulase e pectinase num tratamento preliminar do resíduo, seguindo-se a utilização de uma α amilase e amiloglicosidase. O mesmo autor afirma que a produção de álcool a partir do resíduo de mandioca foi 1.5 vezes maior do que a partir da raiz, devido ao custo alto das enzimas.

4.4.3 Teor de amido residual nos hidrolisados

A tabela 4.5 apresenta o resultado das análises de amido residual nos hidrolisados.

Tabela 4.5: Amido residual presente nas suspensões após a hidrólise.

	Concentração	Amido Residual
Malte	(%)	(g/L)
	4,0	21,97 ($\pm 12,0$)
Cevada	8,0	9,03 ($\pm 2,1$)
	12,5	5,39 ($\pm 4,4$)
	4,0	18,82 ($\pm 5,6$)
Trigo	8,0	15,45 ($\pm 7,7$)
	12,5	12,44 ($\pm 2,3$)
	4,0	18,54 ($\pm 2,8$)
Centeio	8,0	17,66 ($\pm 4,1$)
	12,5	19,24 ($\pm 4,3$)
	4,0	28,91 ($\pm 18,4$)
Milho	8,0	10,29 ($\pm 2,8$)
	12,5	11,19 ($\pm 12,4$)

Para os maltes de cevada, trigo e milho, pode ser observada uma diminuição acentuada no teor de amido residual com o aumento da concentração de malte adicionada. Já para os hidrolisados feitos a partir de centeio, não houve uma redução na quantidade de amido presente no hidrolisado final. Os menores teores de amido residual foram encontrados quando se utilizou o malte de cevada na concentração de 12,5%.

É importante salientar que esta quantidade de amido presente se deve ao amido não hidrolisado tanto da fécula de mandioca, quanto do próprio malte o que acarreta aumento na quantidade de amido residual.

4.5 Conclusão

O resultado da análise de variância mostrou que a interação entre tipo e concentração de malte é significativa, não se podendo analisar os fatores separadamente. Isto quer dizer que a melhor concentração depende do tipo

de malte sendo necessário proceder à decomposição da interação para melhor interpretação.

Os modelos ajustados foram significativos para cevada, milho e centeio. Entretanto, para centeio a variação do rendimento com a concentração foi muito pequena. Para trigo não houve ajuste do modelo linear, indicando que não houve o aumento do rendimento em função da concentração de malte.

O malte de cevada mostrou ter maior eficiência na hidrólise do amido de mandioca, apresentando resultados de rendimento próximos ao teórico (93% de eficiência) quando usada na concentração de 12,5% em relação à massa de amido. Este resultado pode ser explicado pela maior atividade das enzimas, resultado do aprimoramento das técnicas de malteação e secagem, que garantem maior qualidade das enzimas. Apesar da baixa atividade amilolítica, o milho apresentou resultados de rendimento próximos ao da cevada quando na concentração de 12,5%, com eficiência de 89,75%. O milho também apresentou maior formação de glicose que os outros maltes testados. Estes fatos talvez possam ser explicados por uma maior afinidade das amilases do milho pelo amido de mandioca. O conhecimento das características da enzima e o aprimoramento das técnicas de malteação e secagem podem vir a tornar este cereal uma fonte interessante de enzimas amilolíticas, já que se trata de matéria-prima de custo muito menor comparado a outros cereais como a cevada por exemplo.

O malte de centeio apresentou os valores de rendimento e eficiência mais baixos, não apresentando acréscimos significativos nestes parâmetros com o aumento da concentração. De maneira semelhante, o trigo não demonstrou um aumento linear do rendimento com o aumento da concentração, porém seu rendimento foi superior ao do milho e centeio e próximo ao da cevada na concentração 8%.

5. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DOS MOSTOS OBTIDOS DO AMIDO DE MANDIOCA HIDROLISADO PELAS ENZIMAS DOS MALTES

5.1 Introdução

Amido é uma fonte barata, limpa e renovável fonte de carbono para a produção de biocombustíveis.

Geralmente a conversão de amido a etanol passa por etapas de cozimento, liquefação, sacarificação e fermentação. Este grande número de etapas causa uma elevação do custo do processo, devido a gastos com energia e insumos (WOICIECHOWSKI *et al* 2002).

A redução de custos é um objetivo evidente para a produção de álcool de fontes amiláceas. Isto poderia ser atingido, dentre outras maneiras, pela redução do consumo de enzimas amilolíticas utilizadas no processo (KŁOSOWSKI *et al*, 2006). Muitos estudos têm sido desenvolvidos visando aperfeiçoar o processo de produção de álcool de amiláceos (KŁOSOWSKI *et al*, 2006, ÜLGEN *et al*, 2002, VERMA *et al*, 2000).

A utilização de microrganismos capazes de hidrolisar amido e posteriormente convertê-lo a etanol tem recebido grande atenção pelos pesquisadores. As leveduras do gênero *Saccharomyces*, que tradicionalmente são utilizadas na produção de etanol, não possuem a habilidade de hidrolisar amido. Devido este fato, alterações genéticas têm sido feitas nestes microrganismos, com o objetivo capacitá-los a utilizar este tipo de substrato (LIU *et al*, 2004). Geralmente é inserido nestas leveduras, material genético de outro tipo de microrganismos, como fungos do gênero *Aspergillus*, ou bactérias do gênero *Bacillus*. (LIN *et al*, 1998, LATORRE-GARCÍA *et al* 2004). *Saccharomyces diastaticus* é uma variedade de *S. cerevisiae*, que tem a capacidade de utilizar amido como substrato, por

possuir a capacidade de produzir glicoamilase. Entretanto, este microrganismo não é capaz de se desenvolver em amido nativo ou insolúvel. Isto se deve ao fato de a enzima produzida por este microrganismo não possuir um domínio de ligação ao amido, que está presente na glicoamilase produzida por *Aspergillus niger*, por exemplo (VERMA *et al*, 2000, LATORRE-GARCÍA *et al* 2004).

As enzimas α e β amilases têm a capacidade de hidrolisar apenas as ligações α (1-4) da molécula de amido, produzindo glicose, maltose e deixando resíduos de dextrinas, devido a não capacidade de quebrar as ligações α (1-6) da amilopectina (LEWIS e YOUNG, 1995, MENEZES, 1982), enquanto que a enzima glicoamilase é capaz de hidrolisar tanto as ligações α (1-4) quanto as α (1-6) (WHITAKER, 1994, BOYER, 1971).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de duas culturas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces diastaticus*, na produção de etanol a partir de um mosto de amido de mandioca hidrolisado com enzimas de maltes de cereais, visando um aproveitamento do amido residual não hidrolisado pelas amilases dos maltes e conseqüentemente, um aumento na produção de álcool e conhecer a composição dos produtos formados durante a fermentação.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Materiais

a) Enzima Comercial

Foi utilizada a enzima Spirizymel Fuel cedida pela NOVOZYMES (Araucária, Paraná). A enzima utilizada é uma amiloglicosidase produzida por *Aspergillus niger*. Foi utilizada na concentração de 0,06% de enzima em relação à massa seca de amido em pH 4,5 e a 70°C, que são as condições ideais de ação da mesma, segundo recomendações do fabricante.

b) Leveduras

Foram utilizados dois tipos de culturas fermentativas, uma de *Saccharomyces cerevisiae* de baixa fermentação de utilização cervejeira e *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007, uma levedura que apresenta a capacidade de secretar glicoamilase e crescer em amido solúvel (VERMA, 2000). *S. cerevisiae* Saflager W-34/70 foi fornecida pela empresa Agrária (Guarapuava, Paraná, Brasil) na forma liofilizada enquanto que *S. diastaticus* foi adquirida do banco de culturas na forma de *slants* refrigerados da fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil).

5.2.2 Metodologias

a) Determinação de sólidos solúveis no mosto de fermentação

Foi feita por meio de refratometria, utilizando refratômetro portátil. Uma gota da amostra era disposta sobre o prisma do equipamento e este era colocado contra a luz para se ter a leitura do teor de sólidos solúveis, expresso em Graus brix. Foi utilizado um refratômetro de Brix Instrutherm RT 30 ATC com escala de 0 a 32°Brix.

b) Determinação do teor alcoólico dos mostos

Foi feito de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005). Coletou-se 100mL do mosto fermentado, em seguida destilou-se em destilador Gibertini, obtendo-se o destilado na mesma concentração alcoólica do mosto original. O destilado foi analisado por picnometria para determinação da densidade relativa da amostra a 20°C. Através do uso de uma tabela obteve-se o teor alcoólico de acordo com a densidade relativa da amostra.

c) Determinação do pH

Foi feita através de pHmetro digital da marca WTW, modelo pH330i de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005).

d) Determinação da acidez total dos mostos

Foi feita por titulometria, com utilização de solução de NaOH 0,1N. Dez mL da amostra foram diluídos até 100mL com água destilada e foram usadas 3 gotas de fenolfetaleína como indicador. A acidez foi calculada em função da quantidade de base utilizada para neutralizar os ácidos presentes. Os resultados foram expressos em miliequivalente de NaOH (Instituto Adolfo Lutz, BRASIL, 2005).

e) Determinação do teor de amido

Foi feita com objetivo de determinar o teor de amido residual presente nos mostos após a fermentação.

Tem como base a hidrólise do amido presente na amostra pela ação de base e ácido para formação de açúcares redutores. Os açúcares redutores formados são determinados como descrito no Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005). O teor de amido é calculado pela equação abaixo.

$$\% \text{ Amido} = \frac{100Vf}{mv} 0,9$$

Onde: V=volume da solução da amostra;

f = fator das soluções de Fehling

m = massa da amostra

v = volume da solução da amostra gasto na titulação

0,9 = fator de transformação de açúcares redutores em amido.

5.2.3 Procedimento experimental das fermentações

a) Preparo dos mostos

Na preparação dos mostos para fermentação para *S. cerevisiae*, foram feitas suspensões de massa 1 kg contendo 12% de fécula de mandioca. A concentração de malte utilizada para esta etapa foi de 12,5% em relação à massa de amido, devido esta apresentar maior eficiência de hidrólise na etapa anterior do experimento. A suspensão de fécula foi aquecida até 100°C por 5 minutos sob agitação até a total gelatinização do amido. O malte foi adicionado quando a pasta de amido atingiu a temperatura de 50°C a 55°C, sob agitação para promover a interação da enzima com o substrato. As suspensões foram mantidas a temperatura de 50°C sob agitação por 24°C para completa ação das amilases. Os mostos de *S. diastaticus* foram preparados de forma semelhante aos de *S. cerevisiae*, alterando-se apenas o tempo de hidrólise de 24h para 10 minutos, de forma a obter-se apenas uma redução da consistência do amido gelatinizado. Após este tempo a suspensão foi resfriada até 28°C. A enzima Spirizyme Fuel foi utilizada na concentração de 0,1% em relação à massa seca de amido, pH 4,5 e na temperatura de 70°C, como recomendado pelo fabricante.

b) Filtração do mosto

Após a o término da hidrólise, o mosto foi filtrado com a finalidade de se retirar a parte não hidrolisada tanto do malte quanto da própria mandioca. Para isto foi utilizada uma malha sintética usada no dessoramento de queijos (dessorador). O mosto foi caracterizado em relação a sólidos solúveis totais, acidez e pH.

c) Fermentação dos mostos

Os mostos foram enriquecidos com sulfato de amônio (NH_4SO_4) (1g/L), fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) (0,1g/L) e sulfato de magnésio hepta

hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,2g/L). O pH do mosto foi ajustado para 5,3 como o uso de H_2SO_4 quando necessário.

A fermentação foi conduzida em escala de laboratório em balões de vidro de 3 litros, providos de tampas possuindo dispositivo para liberação de CO_2 e para coleta de amostra através de seringas de 20mL. Ao volume de mosto de 1 L foram inoculados 0,4% da levedura liofilizada (*Saccharomyces cerevisiae*) previamente reativadas por 30 minutos a 30°C no uma alíquota 50mL do próprio meio de fermentação.

A levedura *Saccharomyces diastaticus* adquirida em *Slants* refrigerados, foi propagada em meio YEPS (extrato de levedura 1%, peptona 1%, e amido solúvel 2%) por 48 horas, à 28°C e 150 RPM, de acordo com VERMA *et al*, 2000. Este procedimento foi feito no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. O volume de inóculo utilizado na fermentação foi de 10% em relação ao volume do mosto. O número de células do inóculo foi de $1,79 \times 10^7$ células por mililitro. O número de células foi determinado pelo uso de lâmina de Thoma (MATHER e ROBERTS, 1998).

Foi feito o acompanhamento do processo fermentativo pela medição do consumo de substrato, geração de produto, pH e acidez conforme descrito nos itens 5.2.2 (a), (b), (c) e (d) em intervalos de 12 horas até 120 horas para *S. cerevisiae* e 96 horas para *S. diastaticus*. O final das fermentações foi definido pela medição do teor de açúcares redutores no meio. A fermentação foi conduzida em incubadora BOD da marca NovaÉtica, na temperatura de 28°C durante 120h.

5.2.4 Análises cromatográficas

a) Cromatógrafo a gás e coluna cromatográfica

Utilizou-se nesta etapa um cromatógrafo a gás GC 17A Shimadzu com detector de ionização de chama (GC-FID), equipado com coluna capilar de sílica fundida PAG, de caráter muito polar, com as seguintes dimensões: (30 m de comprimento x 0.25 mm de espessura do filme x 0.25 μm de diâmetro

interno). Foi usado o hélio como gás de arraste e também o ar sintético e o gás hidrogênio, todos com alto grau de pureza (99, 999%).

b) Preparo das amostras

Um volume de 100mL das amostras finais do fermentado foram destiladas em aparelho destilador eletrônico Gibertini recolhendo-se 2/3 do volume inicial e completando-se com água destilada até o volume original de 100mL. Desta maneira não houve concentração de voláteis e as concentrações dos analitos determinados correspondem àquelas presentes nos mostos no momento da amostragem.

c) Preparo das curvas padrão

Foram preparadas soluções-padrão para cada um dos álcoois superiores nas concentrações: (60, 150, 300, 450, 600, 1200) mg/L, em solução de etanol/água (40:60 v/v). A quantificação foi realizada pela interpolação em curva padrão. Os padrões de acetaldeído, acetato de etila, metanol, 1 propanol, álcool isobutílico e álcool isoamílico foram obtidos da empresa VETEC (Rio de Janeiro).

d) Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: temperatura inicial de 35°C por 5 minutos, elevando a uma taxa de 10°C por minuto até 100°C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos.

A temperatura do injetor a 180°C; Temperatura do detector a 200°C; Vazão do gás de arraste (He) a 1 mL/min; Vazão da chama (H₂): 20 mL/min; Vazão do ar sintético: 175 mL/min; Razão de divisão (split) de 10.

5.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado na etapa de fermentação foi inteiramente casualizado disposto em arranjo fatorial 5x2, onde se tem cinco

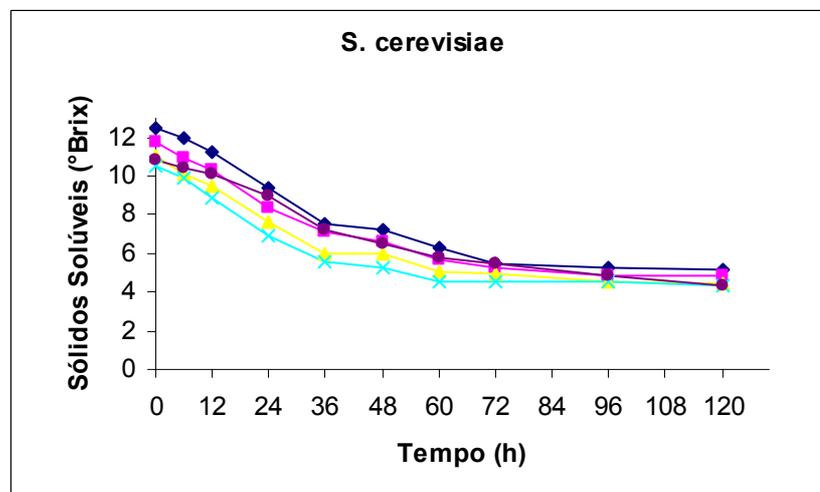
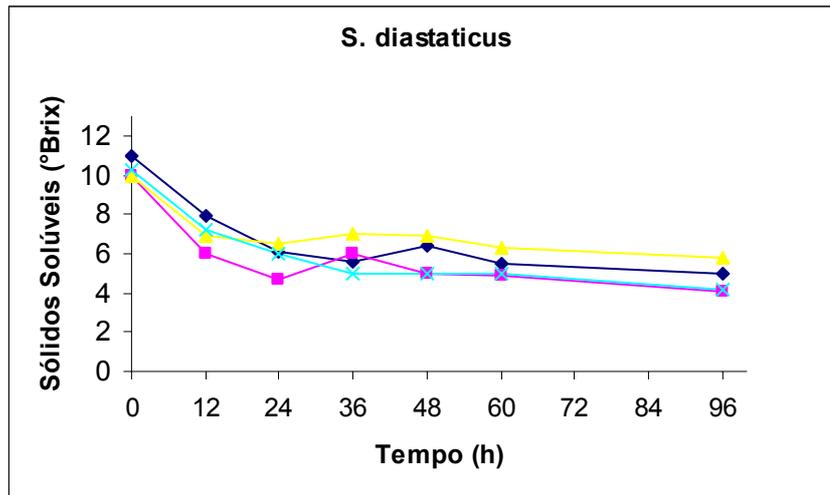
fontes de enzimas (maltes de trigo, milho, cevada e centeio e uma enzima comercial) e dois tipos de cultura de leveduras. Os dados foram analisados por meio de análise de variância verificando a influência do tipo de malte, da levedura e da interação entre os dois fatores na eficiência de fermentação, hidrólise do amido e na composição dos produtos formados na fermentação. Os dados foram analisados por meio do programa SAS (*Statistical Analysis System*) licenciado para Universidade Federal de Viçosa. O experimento foi feito em duas repetições.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Acompanhamento da fermentação

A seguir são apresentados os resultados das medições dos parâmetros cinéticos obtidos no decorrer das fermentações.

Na figura 5.1 a seguir está apresentada a evolução do consumo do substrato no decorrer das fermentações conduzidas por *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces diastaticus*.

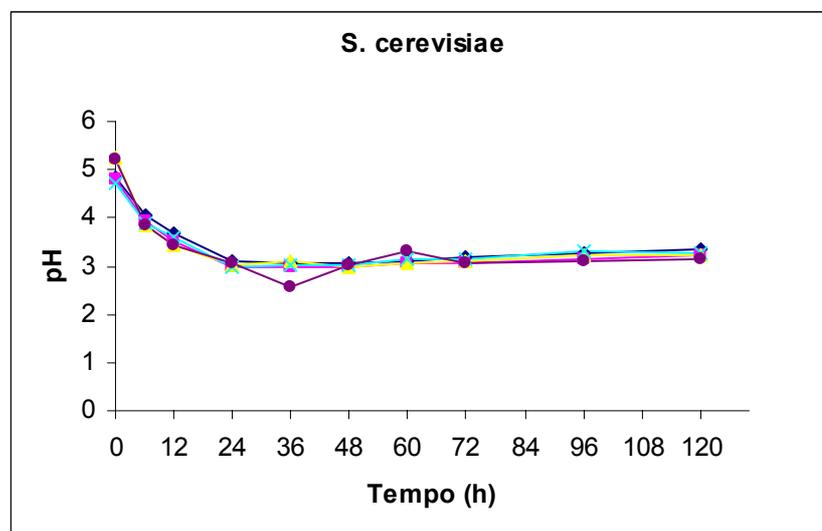
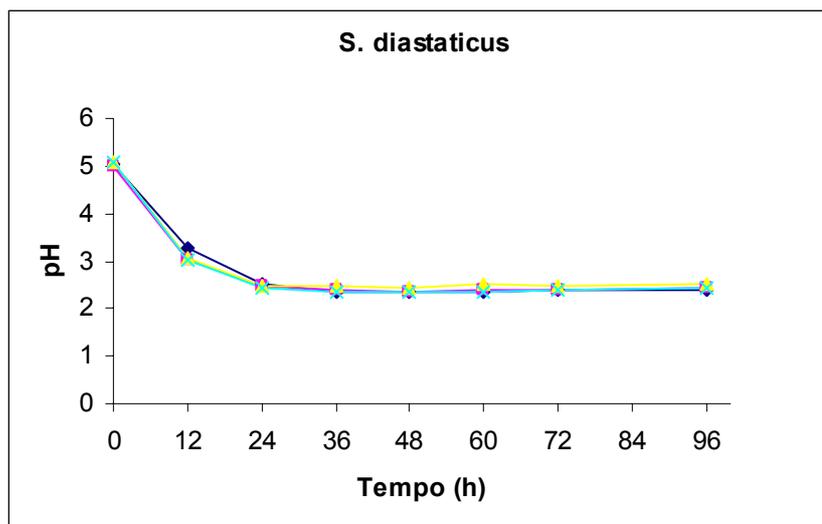


◆ Trigo ▲ Milho × Centeio ■ Cevada ● Spirizyme Fuel (controle)

Figura 5.1: Evolução do consumo do substrato durante o processo fermentativo para *S. diastaticus* e *S. cerevisiae*. Os resultados são médias de duas repetições.

Nas fermentações onde *S. diastaticus* foi utilizada como agente fermentativo, pode-se observar queda mais intensa no teor de sólidos solúveis nas primeiras 24 horas de fermentação. Para *S. cerevisiae*, o consumo de sólidos solúveis foi mais intenso até as primeiras 36 horas do processo, sendo o consumo mais lento a partir deste ponto. O brix final dos mostos foi, em média de 4,77 para *S. diastaticus* e de 4,61 para *S. cerevisiae*. A medição de sólidos solúveis no mosto serviu apenas como um parâmetro de acompanhamento da evolução da fermentação, porque vários compostos, como ácidos e álcoois, podem estar interferindo no índice de refração da amostra e, portanto no resultados da leitura.

Em todas as fermentações pode-se notar queda rápida do pH nas primeiras 24 horas do processo fermentativo e após este período, o valor do pH mantém-se praticamente constante até o fim, como mostrado na figura 5.2 a seguir. Entretanto o valor final do pH para *S. diastaticus* foi menor que para *S. cerevisiae*. O valor final médio do pH dos mostos de *S.cerevisiae* foi de 3,24 e para *S. diastaticus* foi de 2,43.

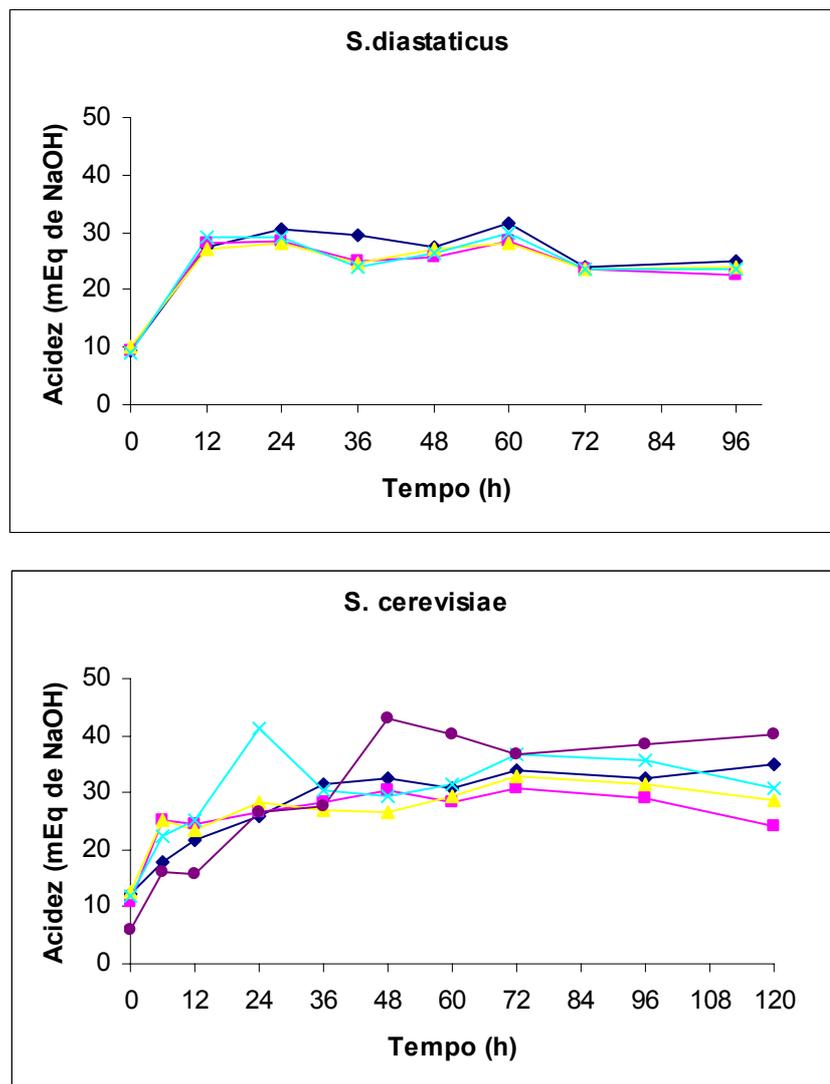


◆ Trigo ▲ Milho × Centeio ■ Cevada ● Spirizyme Fuel (controle)

Figura 5.2: Potencial hidrogeniônico (pH) dos mostos durante o processo fermentativo para *S. diastaticus* e *S. cerevisiae*. Os resultados são médias de duas repetições.

Como pode ser visto na figura 5.3, para *S. diastaticus*, os valores para acidez total tiveram elevação nas primeiras 12 horas de fermentação,

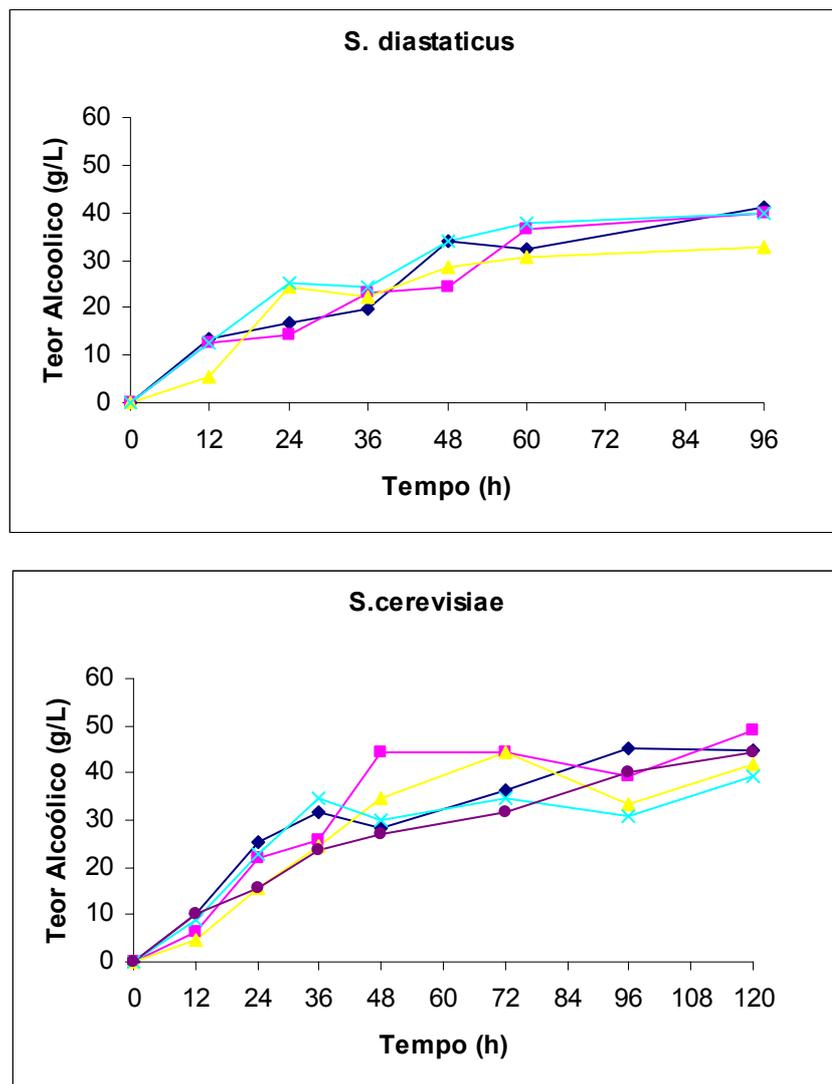
apresentando pequenas oscilações até 72h e estabilizando-se até fim do processo. Já para *S. cerevisiae*, ocorreu aumento da acidez total dos mostos principalmente nas primeiras 36 horas de fermentação e a partir deste ponto, os valores ou se mantiveram constantes ou variaram muito pouco entre as fontes de enzimas testadas. O valor da acidez final dos mostos ficou em 23,77 mEq de NaOH para *S. diastaticus* e 31,77 mEq de NaOH para *S. cerevisiae*.



◆ Trigo ▲ Milho × Centeio ■ Cevada ● Spirizyme Fuel (controle)

Figura 5.3: Acidez dos mostos durante o processo fermentativo para *S. diastaticus* e *S. cerevisiae*. Os resultados são médias de duas repetições.

Os teores alcoólicos mais elevados foram obtidos após 120 horas de fermentação para *S. cerevisiae* e 96 horas para *S. diastaticus*. Apesar de maior consumo do substrato nas fermentações feitas com *S. diastaticus*, isto não se reverteu em maior rendimento alcoólico. Talvez esta levedura consuma energia para a produção da enzima amilolítica, o que causaria uma diminuição do açúcar destinado para as vias metabólicas produtoras de álcool. Na figura 5.4 a seguir pode se observar a evolução da formação de produto durante o processo fermentativo.



◆ Trigo ▲ Milho × Centeio ■ Cevada ● Spirizyme Fuel (controle)

Figura 5.4: Evolução geração de produto (etanol) durante o processo fermentativo para *S. diastaticus* e *S. cerevisiae*. Os resultados são médias de duas repetições.

A tabela 5.1 apresenta os valores médios dos teores alcoólicos obtidos ao final da fermentação.

Tabela 5.1: Teores alcoólicos dos tratamentos testados após o fim das fermentações.

Fonte de enzima	Teor alcoólico (g/L)*	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. diastaticus</i>
Centeio	39,10 (±6,14)	39,89 (±0,55)
Cevada	48,98 (±7,82)	39,89 (±0,55)
Milho	41,87 (±5,58)	32,78 (±1,67)
Trigo	44,63 (±1,67)	41,08 (±1,11)
Spirizyme Fuel	44,24 (±6,70)	*****
Média	43,76	38,41

De acordo com os resultados das análises estatísticas, a interação entre fonte de enzima e o tipo de levedura não foi significativa em relação à produção de álcool. A concentração de álcool presente nos mostos também não variou de forma significativa entre os maltes e a enzima comercial. Ou seja, o tipo de enzima não foi significativo, ao nível 5% de probabilidade, na produção do álcool a partir de amido de mandioca, portanto qualquer um dos maltes ou a enzima purificada podem ser utilizados como fonte de enzima para a hidrólise do amido. Houve diferença significativa entre os dois tipos de leveduras testados, sendo que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi a que apresentou maior potencial em relação à produção de álcool pelo teste t a 5% de probabilidade.

Os resultados deste trabalho estão próximos aos apresentados por BIROL *et al* (1998) em um trabalho no qual obtiveram rendimento de 43,8g/L de etanol em um meio com 10% de amido. Também estão próximos aos apresentados por JAMAÍ *et al* (2007), onde se obteve 43.1 g de etanol/L em 65 h a partir de amido solúvel 9% (p/v).

5.4.2 Rendimentos das fermentações

Com o objetivo de se avaliar a eficiência das fermentações, foram calculados os rendimentos teóricos ($Yp/s_{\text{teórico}}$) e comparados com os rendimentos obtidos (Yp/s_{real}). O cálculo do rendimento teórico é mostrado na equação abaixo:

$$Yp/s_{\text{Teórico}} \text{ (g/g)} = \frac{92}{180} = 0,51$$

Em que: 92 é a massa molecular de duas moléculas de etanol produzidas a partir da fermentação alcoólica de uma molécula de glicose e 180 é a massa molecular da glicose.

Os valores de rendimentos teóricos são muito difíceis de encontrar na prática, devido à utilização de substrato para outras funções da célula ou contaminações por exemplo.

A eficiência é considerada como o valor percentual em relação ao rendimento teórico que se conseguiu obter em uma fermentação. O cálculo está mostrado na equação abaixo:

$$\varepsilon = \frac{Yp/s_{\text{REAL}}}{Yp/s_{\text{TEÓRICO}}} 100$$

Os valores de rendimentos teóricos, rendimentos reais e de eficiência das fermentações estão apresentados na tabela 5.2 a seguir.

Tabela 5.2: Rendimentos teóricos e reais e eficiências das fermentações.

Enzima	<i>S.cerevisiae</i>			<i>S.diastaticus</i>		
	Yp/s Teórico (g/L)	Yp/s Real (g/L)	E (%)	Yp/s Teórico (g/L)	Yp/s Real (g/L)	ε (%)
Trigo	0,51	0,45	89	0,51	0,35	68
Cevada	0,51	0,44	87	0,51	0,34	67
Centeio	0,51	0,41	79	0,51	0,34	67
Milho	0,51	0,39	77	0,51	0,28	55
Spirizyme	0,51	0,37	72	*****	*****	*****

As análises de variância indicaram que a influência da fonte de enzima, bem como a interação entre enzima e levedura foi não significativa ao nível de 5% de probabilidade. *S. cerevisiae* apresentou valores de rendimento estatisticamente maiores pelo teste t. Isto talvez demonstre menor tolerância de *S. diastaticus* à elevadas concentrações de etanol ou utilização de parte do substrato para outras funções metabólicas da célula.

Os melhores resultados obtidos estão próximos aos encontrados por SRINORAKUTARA *et al* (2004), que encontraram uma maior concentração de etanol de 36,2 g/L, correspondente a 91% do rendimento teórico depois de 24 horas de fermentação, a uma concentração inicial de açúcares redutores de 89.2 g/l, oriundo de resíduo de amido de mandioca, hidrolisado com as enzimas celulase e pectinase num tratamento preliminar do resíduo, seguindo a utilização de uma α amilase e amiloglicosidase.

Alguns dos resultados obtidos para *S. cerevisiae* são superiores aos encontrados por MOJOVIĆ *et al* (2006), que obtiveram um rendimento de etanol de mais de 80% em relação ao teórico trabalhando com farinha de milho hidrolisada com α amilase e amiloglicosidase.

Em comparação com JAMAI *et al* (2007), que encontraram rendimentos de 96% estudando a produção de etanol utilizando amido como substrato e a levedura *Candida tropicalis* como agente de fermentação, nas formas livre e imobilizada, os resultados deste trabalho são bem inferiores.

Também são inferiores aos apresentados por VERMA *et al* (2000), que encontraram eficiências de fermentação de 93%, trabalhando com uma

co-cultura de *S. cerevisiae* e *S. diastaticus* cultivadas em amido solúvel 60g/L.

5.4.3 Amido residual nos mostos

O amido residual dos mostos se deve ao fato de que as amilases de cereais são incapazes de hidrolisar as ligações α (1-6) da molécula de amilopectina. Estas moléculas de amido de menor tamanho não podem ser metabolizadas diretamente pela levedura.

Saccharomyces diastaticus produz um tipo de glicoamilase que hidrolisa tanto as ligações α (1-4) quanto as α (1-6), agindo a partir de cadeias pequenas de dextrinas, gerando glicose, que é metabolizada pela célula (VERMA *et al*, 2000, LATORRE-GARCÍA *et al* 2004).

A tabela 5.3 mostra o resultado das análises de amido residual nos mostos fermentados.

Tabela 5.3: Quantidade de amido residual dos mostos após a fermentação.

Amido residual (% em relação ao teor inicial)		
Malte	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. diastaticus</i>
Milho	9,33 (\pm 3,36)	4,16 (\pm 1,41)
Cevada	4,5 (\pm 3,67)	2,45 (\pm 1,23)
Trigo	10,37 (\pm 1,95)	1,58 (\pm 0,01)
Centeio	16,04 (\pm 3,62)	2,12 (\pm 0,29)

A interação entre levedura e tipo de malte foi significativa ao nível de probabilidade $\alpha = 5\%$. Os resultados das análises estatísticas mostraram que a utilização da levedura *Saccharomyces diastaticus* foi mais eficiente em relação a degradação do amido residual dos mostos, pelo teste t ao nível de significância de $\alpha = 5\%$ para os mostos onde se utilizou os maltes de milho, trigo e centeio como fontes de enzimas. Para o malte de cevada não houve

diferença significativa entre as leveduras. Os resultados da degradação do amido por *S. diastaticus* variaram entre 97,92% a 99,21%.

É interessante também ressaltar que a temperatura ideal de ação das glicoamilases se encontra em torno de 60°C (SANTOS, 2006, SURMELY *et al*, 2003), valor muito acima da temperatura de 28°C, na qual as fermentações foram conduzidas. Mesmo assim pode-se observar uma ação marcante da enzima na degradação do amido.

Estes valores são superiores aos encontrados por VERMA *et al* (2000), em seus melhores resultados, onde obtiveram 78% de degradação do amido inicial do mosto com 100g/L de amido solúvel, a partir de uma co-cultura de *S. cerevisiae* e *S. diastaticus*.

Os resultados são superiores também aos encontrados por LIN *et al* (1998) obtiveram um consumo de amido de 82% em 6 dias de cultivo com células de *Saccharomyces cerevisiae* que expressavam glicoamilase de *Aspergillus awamori*, cultivadas em meio contendo 1% de amido solúvel.

Os valores acima relatados estão próximos ao encontrados por KNOX *et al* (2004) que obtiveram 100% de degradação de amido após 100h com uma levedura recombinante codificada como “stell7”, transformada com o gene de glicoamilase de *S. fibuligera*, produzindo 21 g etanol por litro com coeficiente de rendimento de 0.4 após de 120 h de cultivo anaeróbico.

FERREIRA *et al* (2005), produzindo aguardente de mandioca, utilizando malte de milho como fonte de enzimas amilolíticas, obteve uma conversão do amido a açúcares próxima dos 17%.

Entretanto, apesar da maior degradação do amido nas fermentações conduzidas com *S. diastaticus*, a quantidade de álcool presente nestas não foi superior às encontradas para *S. cerevisiae*. Isto pode indicar que a glicose gerada pela degradação do amido pela ação da enzima produzida pela levedura estaria sendo direcionada para geração de algum outro produto ou para outra função metabólica da célula, ou então indicaria uma baixa tolerância e *S. diastaticus* ao etanol.

5.4.4 Balanço de massa da produção álcool de mandioca

Foi feito o balanço de massa da produção de álcool de mandioca obtido através da metodologia utilizada neste estudo. Para isto, utilizou-se os dados da produção média de brasileira, que é de 13 t/ha (VENTURINI FILHO e MENDES, 2003). Partindo-se deste dado juntamente com dados da composição da mandioca e dos rendimentos alcoólicos médios obtidos neste trabalho para *S. cerevisiae* (40,4%) e *S. diastaticus* (38,4%), estabeleceu-se o balanço de massa, como mostrado na figura 5.2 abaixo.

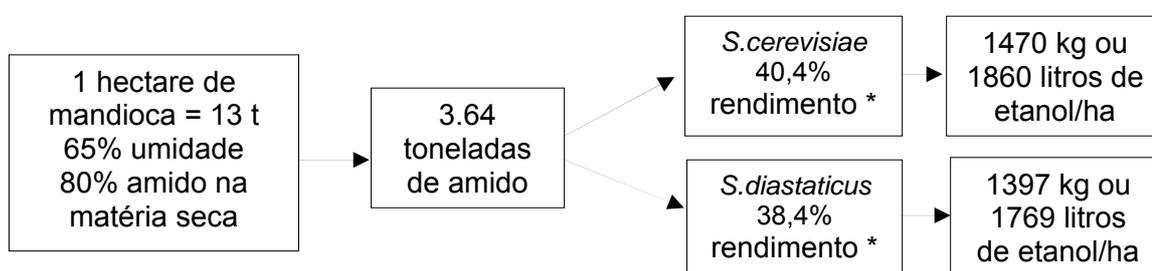


Figura 5.2: Balanço de massa da produção de álcool a partir de amido de mandioca.

* Conversão microbiológica de massa de amido em massa de etanol desse trabalho.

De acordo com o Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio (MDIC), a produtividade média da cana-de-açúcar no Brasil em 2004 ficou em 74 t/ha e a produtividade de álcool em 80 litros por tonelada o que gera uma produção de 5920 litros por hectare (FREITAS, 2005). Portanto os valores obtidos ainda são muito inferiores em relação ao obtidos com a cana-de-açúcar. Estudos na melhoria da produtividade agrícola da mandioca, melhorias dos processos de hidrólise e fermentação, além daqueles voltados para os custos do processo são de extrema importância para a viabilização da produção de etanol a partir da mandioca.

Apesar da baixa produtividade por hectare plantado, a mandioca apresenta uma maior produtividade de etanol por tonelada de matéria prima que a cana. Com os dados apresentados acima, seriam obtidos 113,12 litros por tonelada de mandioca e 404 litros por tonelada de amido. As figuras 5.3 e 5.4 apresentam comparações entre fontes de obtenção de etanol.

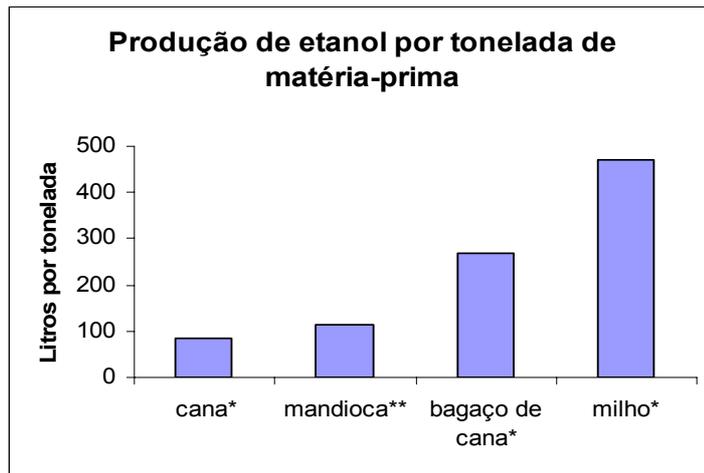


Figura 5.3: Produção de etanol de cana, mandioca, bagaço de cana e milho por tonelada de matéria-prima. *Dados Fermentec (AMORIM, 2006); **Dados experimentais deste trabalho.

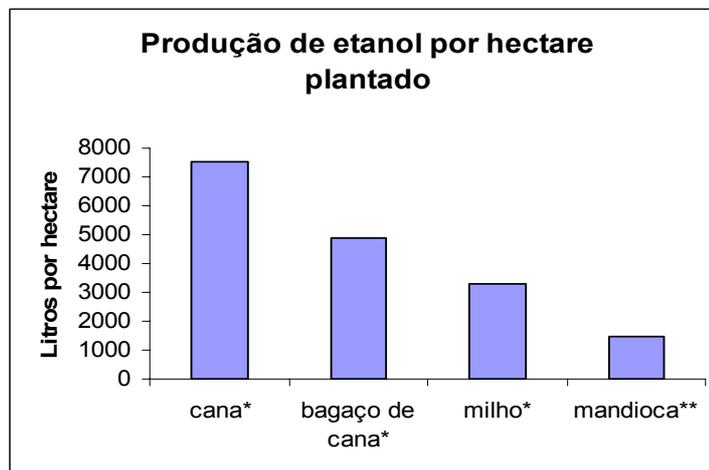


Figura 5.4: Produção de etanol de cana, mandioca, bagaço de cana e milho por hectare de matéria-prima plantada. *Dados Fermentec (AMORIM, 2006); **Extrapolação dos dados experimentais obtidos neste trabalho para produtividade agrícola de 13 ton/ha.

O menor rendimento da mandioca por tonelada de matéria prima quando comparada com o bagaço de cana e milho e provavelmente devido a seu maior teor de umidade. A mandioca apresenta um teor médio de umidade de 60%, o bagaço de cana-de-açúcar de 5% e o milho de 13%. Se estes valores fossem expressos em base seca, os rendimentos seriam bem mais próximos, caracterizando uma maior competitividade tecnológica da mandioca em relação as demais fontes citadas.

A baixa produtividade agrícola justifica menor produtividade por hectare plantado, que poderia também ser melhorada com os incrementos agrícolas de produtividade que têm sido observados.

5.4.5 Análises Cromatográficas

Os principais compostos encontrados nos destilados foram acetaldeído, acetato de etila, metanol, etanol, os álcoois superiores 1propanol, isobutílico e isoamílico. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância pelo programa SAS (*Statistical Analysis System*) licenciado para Universidade Federal de Viçosa. Os dados foram analisados testando a influência do tipo de enzima (malte de trigo, milho, cevada, centeio e a enzima comercial Spirizyme Fuel, da Novozymes), da variedade de levedura, *S.cerevisiae* e *S. diastaticus* e da interação entre os dois fatores.

Os resultados das análises cromatográficas dos mostos fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação estão expresso na tabela 5.4 a seguir.

Tabela 5.4: Teores dos compostos formados durante a fermentação por *S.cerevisiae*.

Enzima	Acetaldeído (mg/100mL amostra)	Acet. Etila (mg/100mL amostra)	Metanol (mg/100mL amostra)	1 Propanol (mg/100mL amostra)	Isobutílico (mg/100mL amostra)	Isoamílico (mg/100mL amostra)
Centeio	1337,69	19,51	1,55	15,74	176,58	36,18
Cevada	1455,70	16,10	1,92	16,78	165,75	35,97
Milho	957,30	13,01	1,15	16,38	157,76	35,58
Trigo	220,57	8,07	1,46	15,52	148,50	26,82
Spirizyme	192,01	9,03	0,46	12,04	196,84	46,34

A tabela 5.5 apresenta os resultados das análises cromatográficas do produto da fermentação de *Saccharomyces diastaticus*.

Tabela 5.5: Teores dos compostos formados durante a fermentação por *S. diastaticus*.

Enzima	Acetaldeído (mg/100mL amostra)	Acet. Etila (mg/100mL amostra)	Metanol (mg/100mL amostra)	1 Propanol (mg/100mL amostra)	Isobutílico (mg/100mL amostra)	Isoamilico (mg/100mL amostra)
Centeio	116,85	11,65	0,49	23,11	158,77	32,68
Cevada	239,07	13,59	0,68	21,93	176,45	37,66
Milho	142,84	8,59	0,63	20,00	165,52	33,00
Trigo	284,20	13,94	0,35	18,85	170,89	37,70

De acordo com os resultados da análise de variância, a interação entre enzima e levedura foi significativa nos resultados de acetaldeído e acetato de etila ao nível de significância $\alpha = 10\%$ pelo teste “F”.

Ao analisar a influência do tipo de levedura dentro de cada tipo de enzima na formação de acetaldeído, pode-se observar que para os maltes de centeio, cevada e milho houve diferença entre as leveduras com relação aos teores de acetaldeído, sendo que a *S. cerevisiae* foi a levedura que mais produziu este composto para esses maltes. Para trigo, não houve diferença entre as leveduras. Quando se comparou a fermentação onde se utilizou enzima comercial com as fermentações conduzidas com *S. diastaticus*, a concentração de acetaldeído foi igual entre estas. Entretanto, as fermentações conduzidas com *S. cerevisiae* e hidrolisados de malte, foram todas superiores em relação ao acetaldeído quando comparadas às fermentações feitas com a enzima comercial. Entre as leveduras, existiu diferença significativa ($p < 0,001$) entre os as fontes de enzima utilizadas para a levedura *S. cerevisiae* a um nível de significância de $\alpha = 10\%$ pelo teste “F”. Já para *S. diastaticus*, a diferença entre as fontes de enzimas foi não significativa a um nível de probabilidade de $\alpha = 10\%$.

As fermentações feitas com os maltes de cevada e centeio foram iguais estatisticamente e apresentaram maior formação de acetaldeído pelo teste de Duncan ao nível de probabilidade de 5%, enquanto que as conduzidas com malte de trigo e enzima comercial foram as que apresentaram menores teores deste composto. Existiu diferença significativa entre as leveduras com relação a formação de acetato de etila pelo teste t a

5% de probabilidade, sendo que os mostos fermentados por *S. cerevisiae* apresentaram maiores concentrações.

Para acetato de etila, ao analisar a influência do tipo de levedura dentro de cada fonte de enzima, notou-se que as leveduras não variaram para o malte de cevada, variando, porém para as outras fontes de enzimas, a um nível de significância de $\alpha = 10\%$ pelo teste “F”. Houve diferença significativa entre as fontes de enzimas para as duas leveduras a um nível de significância de $\alpha = 10\%$ pelo teste “F”.

Os mostos hidrolisados por maltes de centeio e cevada foram os que apresentaram maiores teores de acetato de etila, sendo iguais estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os mostos hidrolisados por maltes de trigo, milho e a enzima comercial apresentaram menores teores e foram estatisticamente iguais pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Não houve diferença significativa entre as leveduras com relação à formação de acetato de etila pelo teste t a 5% de probabilidade.

Para metanol e 1-propanol, a interação enzima*levedura foi não significativa ao nível de significância $\alpha = 10\%$ pelo teste “F” e os fatores agindo separadamente foram significativos ao mesmo nível de significância de acordo com a análise de variância, por tanto a influência de cada fator pôde ser analisada separadamente. As leveduras apresentaram diferença significativa entre si com relação à formação de metanol, sendo que *S. cerevisiae* foi a que obteve maiores valores pelo teste t a um nível de significância de 5% de probabilidade. As fontes de enzima apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância, sendo que todos os maltes testados foram estatisticamente iguais entre si. Os maltes de cevada e trigo foram superiores a enzima comercial, enquanto que os de milho e centeio foram iguais estatisticamente. Com relação ao 1-propanol, *S. diastaticus* apresentou maior formação deste composto pelo teste t ao nível de significância de 5% de probabilidade. Com relação à fonte de enzima, todos os mostos hidrolisados com maltes foram iguais entre si, porém, todos apresentaram teores de 1-propanol maiores do que os observados nos mostos hidrolisados com Spirizyme Fuel, pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Para os álcoois isobutílico e isoamílico não houve influência de nenhum dos fatores testados, sendo os valores de concentração encontrados para estes compostos considerados iguais entre as fontes de enzimas e entre as leveduras.

5.5 Conclusão

A fonte de enzima não foi significativa em relação a produção de álcool, ou seja, não houve diferença entre os maltes e a enzima comercial na produção de etanol. Os maiores teores alcoólicos foram encontrados nas fermentações onde *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como agente fermentativo. Apesar dos teores alcoólicos encontrados nos mostos onde se utilizou *Saccharomyces diastaticus* como agente fermentativo terem sido menores, pode-se observar que a degradação do amido foi mais eficiente nestes, devido a capacidade desta levedura de secretar glicoamilase. É interessante relatar que esta degradação do amido ocorreu a uma temperatura de 28°C, usada na fermentação, que é relativamente baixa em comparação com a temperatura ideal das glicoamilases, que fica em torno de 60°C, o que mostra uma característica interessante do ponto de vista tecnológico. Estudos devem ser feitos para avaliar a utilização desta levedura como ferramenta para a produção de álcool a partir de materiais amiláceos. Melhorias quanto à capacidade desta levedura em produzir álcool poderiam torná-la agente fermentativo de maior interesse. O balanço de massa deste processo revela que a produção de álcool de mandioca por este processo ainda não compete com a cana-de-açúcar, principalmente devido à baixa produtividade agrícola da mandioca, sendo esta questão um importante ponto a ser pesquisado.

Com relação à produção de acetaldeído, os maiores teores foram encontrados nos mostos obtidos a partir de centeio e cevada, tendo *S.cerevisiae* como agente fermentativo. Acetato de etila apresentou maiores teores nos mostos de cevada e centeio, porém, entre as leveduras não houve diferença significativa.

S. cerevisiae apresentou uma maior formação de metanol e *S.diastaticus* foi quem mais produziu 1 propanol. Para os álcoois isoamilico e

isobutilico, nenhuma das fontes de variação foi significativa, ou seja, não houve variação entre os tratamentos.

6 CONCLUSÃO GERAL

As análises físico-químicas das matérias revelaram a conformidade da fécula utilizada com os padrões da legislação brasileira, com teor de amido de 89% e umidade de 11,8%. As concentrações de açúcares (8,44 – 14,09%) e de amido (42,8 – 49,59%) nos maltes utilizados refletem as alterações sofridas pelo grão durante o processo de malteação, onde há conversão de amido em açúcares. As elevadas umidades dos maltes, ente 9,39 e 13,22%, revelam absorção de água durante o armazenamento. Os maltes de cevada e trigo apresentaram maior poder amilolítico dentre aqueles utilizados neste experimento, seguidos milho e centeio, sendo estes iguais entre si. Isto provavelmente se deve ao aprimoramento das técnicas de malteação que potencializam a formação e manutenção da atividade enzimática.

A análise de variância revelou que a interação malte*concentração foi significativa para todos os tratamentos da etapa de hidrólise, não se podendo analisar os fatores separadamente. As análises de regressão mostraram que os modelos lineares se ajustaram bem para cevada, milho e centeio, indicando aumento linear da eficiência de hidrólise como o aumento da adição de malte. Entretanto, para trigo o ajuste dos modelo foram não significativos. O malte de cevada forneceu os maiores valores de hidrólise do amido de mandioca. Apesar da baixa atividade amilolítica, o milho forneceu valores de rendimento próximos aos da cevada na concentração de 12,5%. As suspensões hidrolisadas com malte de milho forneceram teores de glicose maiores que as suspensões dos outros maltes.

Na etapa de fermentação, não houve interação significativa entre o tipo de malte e levedura para a produção de álcool. O tipo de malte não apresentou variação significativa a formação de álcool, sendo que qualquer malte ou a enzima comercial podem ser usados para a obtenção de etanol. Entretanto, houve diferença significativa entre as leveduras, sendo que *Saccharomyces cerevisiae* apresentou maiores teores de etanol, com resultados entre 39,10 e 44,63g de etanol/L. O consumo de amido nos mostos fermentados por *Saccharomyces diastaticus* foi superior ao obtido por *S. cerevisiae* para trigo, centeio e milho, ficando entre 97,92 e 99,21%,

enquanto que para cevada, não houve diferença entre as leveduras. *S. cerevisiae* obteve maiores valores de eficiência de fermentação, atingindo resultados de 89% de eficiência. O balanço de massa do processo revela que, com a atual produtividade média da mandioca brasileira, a produção de álcool a partir desta matéria prima ainda não é ideal, gerando um volume de 1860 litros de etanol/ha, apesar de uma tonelada de mandioca gerar mais álcool que uma tonelada de cana, com produção de 113,12 litros por tonelada de mandioca e 404 litros por tonelada de fécula de mandioca.

As análises estatísticas revelaram que os teores de acetaldeído foram maiores nos mostos produzidos a partir de cevada e centeio, fermentados por *S. cerevisiae*. Acetato de etila teve maior formação nos mostos de cevada e centeio, porém não houve diferença significativa entre as leveduras. Os teores de metanol foram maiores nos mosto fermentados por *S. cerevisiae* enquanto que aqueles fermentados por *S. diastaticus* produziram maiores teores de 1 propanol. Os teores dos álcoois isoamílico e isobutílico não apresentaram variações devido a nenhuma das fontes testadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. V. **Álcool: decana, milho e biomassa**. Palestra Fermentc. [2006?]. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/download/palestras/alcool_canamilhobiomassa.pdf>. Acesso em 18 de out. de 2007.

AMUTHA, R.; GUANASEKARAM, P. Production of Ethanol from Liquefied Cassava Starch Using Co-Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol. 92, n. 6, pág. 560-564. 2001.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Vol. 03. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo - SP, Brasil, 2001. 595 p.

ARAÚJO, N. Q. Tecnologia da fermentação alcoólica dos polissacarídeos. In: Furtado, J. S. **Fermentações Industriais & Transformações Microbianas**. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo. p 139 - 151.1980

BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; MENDU, D. R.; MADICHERLA, N. R.; CHITYALA, A. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology** n. 38, pág. 209–214. 2006.

BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOUGI, E. B. Maximização das Etapas de Produção do Malte de Zea Mays. **Braz. J. Food Technol.**, 5º SIPAL, março, 2005.

BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOUGI, E. B. Caracterização Da Atividade amilásica do malte de milho (*Zea mays* L.). **Acta Sci. Technol.** Maringá, v. 28, n. 1, p. 13-19, Jan./June, 2006.

BIROL, G.; ÖNSAN, Z. İ.; KIRDAR, B.; OLIVER, S.G. Ethanol production and fermentation characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains grown on starch. **Enzyme and Microbial Technology**. n 22, pág. 672-677. 1998

BOSSO, A. A.; MACHADO M. L. Álcool da Cana ou do milho? **Revista Ciências Do Ambiente On-Line**. Fevereiro, 2006 Volume 2, Número 1

BOYER, P. D. **The Enzymes. Hydrolysis: Sulfate esters, carboxyl esters, glycosides**. Volume 5. Terceira Edição. Academic Press. New York and London. 1971.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª Edição. 2005.

BRASIL. **Resolução ANP nº 36 de 06 de Dezembro de 2005**. Especificações do Álcool Etílico Anidro Combustível (AEAC) e do Álcool Etílico Hidratado (AEHC) comercializados pelos diversos agentes econômicos em todo o território nacional, consoante às disposições contidas no Regulamento Técnico nº. 7/2005. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petro/legis_qualidade.asp>. Acesso em: 18 out. 2007.

BRASIL. **Resolução ANP nº 05 de 24 de dezembro de 2005**. Especificações dos álcoois combustíveis, anidro e hidratado, utilizados como padrões nos ensaios de consumo de combustível e emissões veiculares. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petro/legis_qualidade.asp>. Acesso em: 18 out. 2007.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; Urbano, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v. 31, n. 2, p. 429-432, mar/abr, 2007.

BRINGHENTI L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia e Agricultura.** Vol. 20; n.4. Botucatu, São Paulo, 2005.

CAMPOS, M. P. Produção de etanol a partir de matérias-primas sacarinas. In: Furtado, J. S. **Fermentações Industriais & Transformações Microbianas.** Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo. p 92 – 98.1980

CAPANZANA, M.V.; BUCKLE, K. A. Optimisation of Germination Conditions by Response Surface Methodology of a High Amylose Rice (*Oryza sativa*) Cultivar. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, vol. 30, n°2 p. 155 - 163. 1997.

CARAWAY, W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, v.32, p.97-99, 1959.

CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. S. Importância, potencialidades e perspectivas do cultivo da mandioca na América Latina. In: CEREDA, M. P. (Coord.). Agricultura. **Cultura de tuberosa amiláceas latino americanas.** Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Vol. 2, Cap. 2; São Paulo: Fundação Cargill;. 2002. p 350 - 369.

CEPEA/ESALQ. **Valor de produção da fécula cai 7% em 2006, com produção 5,1% maior.** [S.l.] [2006?]. Disponível em:<http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/producao_fecula_2006.pdf>. Acesso em: 10 de out. de 2007.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. O amido com aplicações em produtos para alimentação saudável. In: **Tecnologias, Usos e Potencialidades de**

Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Vol. 3, Cap.14. Fundação CARGILL. p. 355 – 376. 2003.

COOPERSUCAR: **Especificação do Álcool Coopersucar.** [S.I.] Disponível em: <http://www.copersucar.com.br/produtos/por/alcool_etilico.asp>. Acesso em: 18 de out. de 2007. [2007?]

DALLAQUA, M. A. M.; CORAL, D. J. Morfoanatomia. In: CEREDA, M.P (coord): **Agricultura:Culturas de Tuberosas Latino Americanas.** Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 2. Cap.3; São Paulo. Fundação CARGILL, 2002. p.48 – 65.

DAVIS, L.; ROGER, P.; PEARCE, J.; PEIRIS, P. Evaluation of Zymomonas-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. **Biomass and Bioenergy.** n° 30 p. 809–814. 2006

DELGENES J. P.; LAPLACE J. M.; MOLETTA R.; NAVARRO J. M. Comparative study of separated fermentations And cofermentation processes to produce Ethanol from hardwood derived hydrolysates. **Biomass and Bioenergy,** Vol. 11, No. 4, p. 353-360. 1996.

DEWAR, J.; TAYLOR, J. R. N.; BERJAK, P. Determination of Improved Steeping Conditions for Sorghum Malting. **Journal of Cereal Science,** n° 26, p. 129 - 136. 1997.

EDUARDO, M. P. **Hidrólise enzimática de mandioca e puba para a obtenção de xarope de maltose.** Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, São Paulo. 2002.

EHRHARDT, P.; SASSEN, H. **Fermentação.** Vassouras: SENAI-DR/RJ, 1995. 37 p.

EJIOFOR, A. O.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality yeast. **Enzyme and Microbial Technology** 18:519-525, 1996.

ENEJE, L.O.; OGUA, E.O.; ALOH, C.U.; ODIBO, F.J.C.; AGUC, R.C.; PALMER, G.H. Effect of steeping and germination time on malting performance of Nigerian white and yellow maize varieties. **Process Biochemistry**. vol. 39. p 1013 - 1016. 2004.

EVANS, D. E.; MACLEOD, L. C.; EGLINTON, J. K.; GIBSON, C. E.; ZHANG, X.; WALLACE, W.; SKERRITT, J. H.; LANCE, R. C. M. Measurement of Beta-amylase in Malting Barley (*Hordeum vulgare* L.). I. Development of a Quantitative ELISA for Beta-amylase. **Journal of Cereal Science** n°. 26, p. 229–239. 1997.

FERREIRA, G. B.; MELO V. V.; ALMEIDA, J. B.O.; EVANGELISTA, A. F.; SOUZA R. R. Caracterização do Processo de Obtenção de Uma Aguardente de Mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, 5º SIPAL, março, 2005. p. 02 – 07.

FERREIRA. G. B.; MELO, V. V.; LOPES, F. L. G.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOUGI, E. B. Produção de Álcool a partir da Hidrólise do Amido de Mandioca por Amilases do Malte de Milho. Congresso Online Sodebrás. **Anais**. 2006. Disponível em: http://www.sodebras.com.br/art_env/n10/3-06-01.pdf >. Acessado em 10 jul. 2007.

FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F. Estrutura dos grânulos de amido de milho normal e ceroso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Vol.17, nº3. Campinas Sept./Dec. 1997.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S.

Propriedades gerais do amido. Serie “Cultura de tuberosas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargill, v.1, 2001. 224p.

FREITAS, M. **Missão chinesa visita o Brasil para discutir etanol.** Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. [S.l.], [s.n.], 2005. Disponível em: <http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/ascom/noticias/noticia.php?cd_noticia=6378>. Acesso em: 14 de out. de 2007.

GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; BULÉON, A.; PÉREZ, S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. **European Journal of Clinical Nutrition.** v.46, p.3-16, 1992. .

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers.** n° 32, p. 177 – 191. 1997.

GEORG-KRAEMER, J. E.; MUNDSTOCK, E. C.; CAVALLI-MOLINA, S. Developmental Expression of Amylases During Barley Malting. **Journal of Cereal Science.** n° 33 p. 279 - 288. 2001.

GOERING, K. J.; DEHAAS, B. W.; CHAPMAN, D. W.; ESLICK, R. F.; GRAMERA, R. E. New Process for Production of Ultra High Maltose Syrup from Special Genetically Derived Barley. **Starch.** Volume 32, Edição 10 , p. 349 - 352. 1980.

HIZUKURI, S. 1996. Starch: analytical aspects. In: Eliasson, A.-C., Editor, 1996. **Carbohydrates in Food.** Marcel Dekker, New York, pp. 347–429.

HORNSEY, I. S. Elaboración de cerveza. **Microbiología, bioquímica y tecnología.** Editora Acribia, S.A, 2003. 229p.

HOSEIN, R.; MELLOWES, W. A. Malt hydrolysis of sweet-potatoes and eddoes for ethanol production. **Biological Wastes.** Volume 29, n° 4, p. 263-270.1989

JAMAI, L.; ETTAYEBI, K.; EL YAMANI, J.; ETTAYEBI, M. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. **Bioresource Technology**. n. 98, p. 2765–2770. 2007

KENT, N. L. **Technology of cereals**: with special reference to wheat. Pergamon Press. Segunda edição. p. 241-255. 1975.

KNOX A. M.; DU PREEZ J. C.; KILIAN, S. G. Starch fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains transformed with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 34, p. 453–460. 2004.

KŁOSOWSKI G.; CZUPRYN B.; WOLSKA M. Characteristics of alcoholic fermentation with the application of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: As-4 strain and I-7-43 fusant with amylolytic properties. **Journal of Food Engineering**, n. 76, p. 500 - 505. 2006.

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**, vol.118, p.167 -176. 2005.

LEHNINGER A. L; NELSON D. L; COX M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2.Ed. Simões AA, Lodi WRN. São Paulo: Sarvier. p 570-585.1995.

LEONEL, M.; CABELLO, C. Hidrólise enzimática do farelo de amndioca: glicose e álcool. In: Cereda, M. P. (Coord). **Culturas de Tuberosas Latino Americanas**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 4. Cap.22; Fundação CARGILL; p 280 – 291. 2001

LEONEL, M.; CEREDA M. P. Avaliação Técnico-Econômica da Produção de Etanol de farelo de mandioca, utilizando pectinase como enzima complementar. **Energia na Agricultura**. 1998.

LEONEL, M.; CEREDA M. P. Avaliação da Concentração de Pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.20 n.2 Campinas Mai/Ago. 2000.

LEWIS M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. Primeira Edição. Chapman & Hall. 1995. 260p.

LIN, L.; MA, Y.; CHIEN, H.R.; HSU, W. Construction of an amyolytic yeast by multiple integration of the *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology** n° 23. p. 360–365, 1998.

LIU, Z.; ZHANG, G.; LIU, S. Constricting an amyolytic brewig yeast *Saccharomyces pastorianus* suitable for accelerated brewing. **Journal of bioscience and bioengineering** Vol. 98, no. 6, p. 414–419. 2004

LOBO, A. R.; LEMOS SILVA, G. M. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, 16(2). p. 219 - 226, abr./jun. 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBOROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** p. 193 - 265. 1951.

MATHER, J. P.; ROBERTS, P. E. **Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique**. Plenum Press. New York and London. 1998

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C.; FARIAS, A. R. N.; FUKUDA, C. Cultivo da mandioca nas regiões Norte Nordeste do Brasil. In.: **Culturas de Tuberosas Latino Americanas**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 2. Cap.14; Fundação CARGILL.; 2002

MELO, K. L. G. V. **Mandioca e derivados proposta de preço mínimo safra 2006/2007.** [S.l.], [s.n], [2006?]. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/precos_minimos/proposta_de_precos_minimos_safra_2006_07_mandioca_e_derivados.pdf>. Acesso em 15 de out. de 2007.

MENEZES, T. J. B. Importância da sacarificação na produção de alimentos e energia. In: Furtado, J. S. **Fermentações Industriais & Transformações Microbianas.** Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo. p 5 – 11.1980.

MOJOVIĆ, L.; NIKOLIC, S.; RAKIN, M.; VUKASINOVI, M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. **Fuel** n. 85, p. 1750–1755. 2006.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, n° 27 p. 229 - 245. 1999.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases - an overview. **Carbohydrate Polymers**, n° 60, p.163–173. 2005.

NEPA - UNICAMP. **Tabela Brasileira de composição de alimentos / UNICAMP-Versão II – 2ª ed.** - Campinas, SP, 113p. 2006.

NEVES, V. J. M. **Uso do resíduo da produção de farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino.** 2004. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP, 2004.

NIRMALA, M.; SUBBA RAO, M. V. S. S. T.; MURALIKRISHNA G. Carbohydrates and their degrading enzymes from native and malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15). **Food Chemistry**, n° 69, p. 175 - 180. 2000.

OLIVEIRA, M. E.; NETO, W. G. Proálcool: Alternativa ao petróleo? (1975-1980). **Revista Horizonte Científico**. Universidade Federal de Uberlândia, 2003.

PORTO, S. **Mandioca é tema de audiências em Brasília**. [S.l.]. 25 de junho de 2006. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/not.php?id=221>>. Acesso em 18 de out. de 2006.

QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnología de la panificación**. Editora Acribia, S.A. Zaragoza. 1991. 485p.

REED, G.; PEPPLER, H. J. **Yeast Technology**. The AVI publishing company. Westport. 1973. 378p.

REINOLD, R. M. **Manual prático de cervejaria**. 1. ed. São Paulo: Aden, 1997

SANTANA, J. C. C. **Recuperação das enzimas α e β -amilases em sistema aquoso bifásico PEG/CaCl₂ para uso como biocatalizador de amiláceos**. 2005. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. Campinas, SP. 2003. 215p.

SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus awamori***. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual e Ponta Grossa. Ponta Grossa, PR. 2006. 81p.

SANTOS, I. J. **Efeito da temperatura de secagem nas atividades da alfa e beta-amilase durante o processo de malteação de cevada (*Hordeum vulgare L.*) para produção de cerveja**. 1999. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 1999. 138p.

SHANNON, J. C.; GARWOOD, D. L. Genetics and physiology of starch development. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F.

(Editores). **Starch:Chemistry and technology**. Segunda Edição. London: Academic Press, 1984. cap. 3, p. 26 – 79.

SHIGECHI, H.; UYAMA, K.; FUJITA, Y.; MATSUMOTO, T.; UEDA, M.; TANAKA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting α -amylase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, número 17, p. 179 -187. 2002

SILVA, P.H.A. **Etude cinetique et enzymatique au cours de la fermentation primaire em brasserie: influencia dès recoltes, de la concentration cellulaire, de la densite du mount**. Lorraine. 1989. 147 f. These (Docteur Biotechnologies et Industries Alimentaries) – Institut National Polytechnique de Lorraine – École Nationale Supérieure d’ Agronomie et des Industries Alimentares, Nancy. France. 1989.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no Estado sólido**. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2005. 157p.

STUPIELLO, J. P. Matérias-Primas para a obtenção do Álcool; In: Furtado, J. S. **Fermentações Industriais &Transformações Microbianas**. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo. p 66 – 69.1980

SUHASINI, A. W.; MURALIKRISHNA, G.; MALLET, N. G. Free sugars and non-starch polysaccharide contents of good and poor malting varieties of wheat and their malts. **Food Chemistry**, Vol. 60, N°. 4, p. 537 - 540. 1997

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Hidrólise de Amido. In: Cerada, et al (Coord). **Tecnologias, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap.15; Fundação CARGILL.; 2003. p 337 – 448.

SRINORAKUTARA, T.; SUESAT, C.; PITIYONT, B.; KITPREECHAVANIT, W.; CATTITHAMMANIT, S. Utilization of Waste from Cassava Starch Plant for Ethanol Production. **The Joint International Conference on “Sustainable Energy and Environment (SEE)”**. Hua Hin, Thailand. p 344 – 349. 2004.

TERNES, M. Fisiologia da Planta. In: Cereda, M. P. et al (Coord). **Culturas De Tuberosas Latino Americanas**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 2. Cap. 4; Fundação CARGILL.; 2002. 540p.

ÜLGEN K.; SAYGILI B.; ÖNSAN Z.I.; KIRDAR B. Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB. **Process Biochemistry**. v. 37, p.1157–1168. 2002.

VEIGA FILHO, A. A.; RAMOS, P. Proálcool e evidências de concentração na produção e processamento de cana-de-açúcar. **Informações Econômicas**, SP, v.36, n.7, jul. p.48 – 61. 2006.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação Alcoólica de raízes tropicais. In: Cereda, M. P. et al (Coord). **Tecnologias, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap.19; Fundação CARGILL. p. 530 – 575. 2003.

VERMA, G.; NIGAM, P; SINGH A, D.; CHAUDHARY, K.; Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. **Bioresource Technology** 72, p. 261-266. 2000.

VILPOUX, O.; CEREDA, M. P. Processamento de raízes e tubérculos para uso culinário: minimamente processada, embalada a vácuo, pré-cozida congelada e fritas (french-fries). In: Cereda, M. P. et al (Coord). **Tecnologias, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino**

Americanas. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap.4; Fundação CARGILL.p. 81 – 109. 2003.

WALL, J.; ROSS, W. M. Usos del sorgo granífero en la alimentación humana y otros. **Cuadernillo de sorgo** - n. 94 Novembro 2004.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. Segunda Edição. Dekker. 1994

WOICIECHOWSKI, A. L.; NITSCHKE, S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol. 45, n.3: pp 393-400. 2002.

ZASTROW, C. R.; STAMBUK, B. U. Transporte e fermentação de açúcares por leveduras da indústria cervejeira. **Revista Univille**, Volume 5, nº1. 2000.