

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO
(MCC)**

TÍTULO: Produção de hidrolisado enzimático de farinha de batata-doce para fermentação etanólica.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Cabello

Orientado : Juliana Aparecida Marques Eburneo

BAURU - SP

NOVEMBRO / 2009

JULIANA APARECIDA MARQUES EBURNEO

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO
DE FARINHA DE BATATA-DOCE PARA
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Química da Faculdade de Ciências de
Bauru/Unesp, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Licenciado em Química, sob orientação
do Prof. Dr. Cláudio Cabello.

BAURU

2009

JULIANA APARECIDA MARQUES EBURNEO

**PRODUÇÃO DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO
DE FARINHA DE BATATA-DOCE PARA
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

Comissão Examinadora

Bauru, de Novembro de 2009

Bauru-SP

2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Lenise e ao meu noivo Ricardo, que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e Prof. Dr. Cláudio Cabello, pela oportunidade, apoio e incentivo;

À minha mãe Lenise, por todo o carinho, dedicação e esforço para realização de um sonho que hoje podemos desfrutar juntas;

Ao amor da minha vida, Ricardo pela sua compreensão, dedicação, incentivo nos momentos mais difíceis e por todo amor e carinho;

À minha irmã Patrícia, pela ajuda, sinceridade e amizade;

Aos meus animais de estimação que sempre estiveram ao meu lado me trazendo alegria em todos os momentos;

Aos técnicos do Laboratório de Análises do CERAT, Luiz e Priscila, pelo auxílio nas análises e pela amizade consolidada;

Ao Douglas e Sérgio, técnicos do Laboratório de Matérias-primas do CERAT/UNESP pela ajuda no processo de produção da farinha de batata-doce;

As minhas amigas, Juliana Torini, Mayara Frenhe e Gisele Calandrin, que compartilharam comigo todos os momentos felizes e tristes, que foram meu grupo desde o início do curso até o final deste, me incentivando e ajudando, momentos que serão inesquecíveis;

À todos os meus colegas de sala, por todos os momentos vividos e pelas agradáveis lembranças que nunca sairão do meu coração. Pela amizade consolidada entre todos nós, muito obrigada;

Aos meus companheiros de ônibus, por todos os momentos que passamos, durante os cinco longos anos de viagem e pela grande amizade que foi construída;

À todos meus professores, por todo conhecimento que adquiro durante todos estes anos;

À Deus;

Finalmente, a todos que de alguma maneira contribuíram para concretização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."
(Galileu Galilei).

Eburneo, Juliana Aparecida Marques. Produção de hidrolisado enzimático de farinha de batata-doce para fermentação etanólica. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso Licenciatura em Química – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Bauru. 2009.

RESUMO

Recentemente há uma grande busca em se produzir álcool a partir de fontes amiláceas, substituindo assim a cana de açúcar. As fontes mais comuns são a de mandioca, milho e batata-doce, muitas pesquisas estão sendo realizadas e com ótimos resultados.

Neste trabalho fez-se uma avaliação da influência da concentração da matéria seca sobre o processo de hidrólise enzimática em amido de batata-doce na produção de etanol. A partir da batata-doce, produziu-se uma farinha, utilizando um método de baixo custo e com equipamentos de simples operação. Esta farinha de batata-doce foi caracterizada física e quimicamente e a partir destas análises foram preparados os ensaios para a hidrólise enzimática.

O planejamento experimental considerou como variável independente a concentração de matéria seca da farinha de batata-doce em 3 níveis; 10, 15 e 20% na formulação das suspensões que foram ensaiadas. As outras variáveis foram mantidas constantes sendo: temperatura na 1ª etapa de hidrólise de 90°C e tempo de 2 horas; temperatura na 2ª etapa de sacarificação de 60°C e tempo de 17 horas.

Os hidrolisados obtidos nos três ensaios foram transferidos para erlenmeyer de seis litros e inoculados com catalisador biológico, leveduras do gênero *saccharomyces cerevisiae* desidratadas da cepa CAT 1, numa proporção de 5% em massa. Os frascos foram colocados num agitador tipo orbital com temperatura controlada de 30°C e por um tempo de 15 horas. A concentração de açúcares redutores no início e respectivas concentrações de etanol no vinho foram: para a suspensão de 10%, produção de 11,2% de glicose e 2,16% de etanol; na suspensão de 15%,

produção de 13,5% de glicose e 4,39% de etanol; e na suspensão de 20%, produção de 17,5% de glicose e 6,03% de etanol.

Os resultados analisados mostraram que quanto maior a concentração de matéria seca, maior o rendimento de açúcares no hidrolisado, e nas análises de vinho e álcool, foi possível observar que a qualidade dos produtos produzidos melhorou muito com a maior concentração.

Palavras-Chaves: enzima amilolítica; destilação; amido; processo fermentativo.

Eburneo, Juliana Aparecida Marques. Produção de hidrolisado enzimático de farinha de batata-doce para fermentação etanólica. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso Licenciatura em Química – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Bauru. 2009.

ABSTRACT

Recently there is a great quest of producing alcohol from starchy resources, replacing the sugar cane. The most common starchy sources are cassava, maize and sweet potatoes and a lot of research are been realized with excellent results.

In this work it was evaluated the influence of the concentration of dry matter on the enzymatic hydrolysis process of starch from sweet potato for ethanol production. Through the sweet potato was produced a flour using a low-cost method and easy operation equipments. The sweet potato flour was characterized physical and chemically and from these results was prepared the treatments for enzymatic hydrolysis.

The experimental design considered as independent variable the dry matter concentration of the sweet potato flour in 3 levels; 10, 15 and 20% in the formulation of suspensions. The other variables were keeping constant being: temperature in the 1^o hydrolysis step of 90°C and time of 2 hours; temperature in the 2^o saccharification step of 60°C and time of 17 hours.

The hydrolysates obtained at the three assays were transferred to six liter enlerynmeyer and inoculated with a biologic catalyst, *Saccharomyces*, dehydrated yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* CAT 1, at a rate of 5% in weight. The flasks were placed in a shaker type orbital with controlled temperature of 30°C during a time of 15 hours. The initial reducer sugars concentration and respective ethanol concentrations in wine were: 11.2% glucose and 2.16% ethanol in the suspension with 10% of dry matter; 13.5% glucose and 4.39% ethanol with 15% and 17.5% glucose and 6.03% ethanol in suspension with 20% of dry matter.

The results showed that the higher percentage of dry matter carried out to higher sugar yield in hydrolyzed. It was possible observed that products quality improved with a higher concentration of dry matter.

Keywords: amylolytic enzyme; distillation; starch; fermentative process.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Composição centesimal, em base seca, da mandioca e batata-doce.....	2
Tabela 2 – Concentrações em valores médios das análises centesimais realizadas na farinha de batata-doce e valores correspondentes de batata-doce <i>in natura</i> , observado na literatura.....	19
Tabela 3 – Concentrações em valores médios da análise de glicose em mg/dL nas amostras retiradas em tempos diferentes durante o processo de hidrólise.....	20
Tabela 4 – Concentrações em valores médios das análises realizadas no hidrolisado.....	22
Tabela 5 – Concentrações em valores médios do T.O.C das amostras retiradas durante a hidrólise, em uma hora de reação com a amiloglucosidase.....	22
Tabela 6 – Concentrações de glicose no vinho após a fermentação.....	23
Tabela 7 – Porcentagem dos compostos identificados no vinho por cromatografia líquida nos diferentes ensaios.....	24
Tabela 8 – Porcentagem dos compostos identificados no álcool pela cromatografia gasosa nos diferentes ensaios.....	24
Tabela 9 – Valores da análise de Barbet em amostras de etanol originários dos ensaios.....	25

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Molécula de glicose.....	3
Figura 2 – Ligações $\alpha(1,4)$ da molécula de amilose.....	3
Figura 3 – Ligações $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ da molécula de amilopectina.....	4
Figura 4 – Diagrama indicativo das etapas do processo de hidrólise realizado.....	18
Figura 5 – Gráfico da formação de glicose em função do tempo de hidrólise nos ensaios com 10, 15 e 20% m.s.....	21

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Matéria-prima.....	1
1.1.1. <i>Composição química da raiz de batata-doce</i>	1
1.1.2. <i>Composição do amido</i>	2
1.1.3. <i>Produção e mercado consumidor</i>	4
1.2. Uso de fontes amiláceas para produção de etanol.....	7
1.3. Hidrólise do amido.....	8
1.4. Enzimas amilolíticas.....	8
1.4.1. <i>Ação da α-amilase</i>	9
1.4.2. <i>Ação da amiloglucosidase</i>	10
1.5. Fermentação etanólica.....	11
1.6. Destilação.....	12
1.7. Álcool etílico.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Matéria prima.....	15
3.1.1. <i>Produção da farinha de batata-doce</i>	15
3.2. Caracterização da farinha de batata-doce.....	15
3.3. Preparo do hidrolisado.....	15
3.3.1. <i>Etapa de dextrinização</i>	16
3.3.2. <i>Etapa de sacarificação</i>	16
3.4. Fermentação alcoólica.....	17
3.5. Destilação.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Matéria-prima

A batata-doce, (*Ipomoea batatas* L. (Lam.)) é originária das Américas Central e do Sul, sendo encontrada desde a Península de Yucatam, no México, até a Colômbia e agrupa aproximadamente 50 gêneros e mais de 1000 espécies sendo que, dentre elas, somente a batata-doce tem cultivo de expressão econômica. Relatos de seu uso remontam de mais de dez mil anos, com base em análise de batatas secas encontradas em cavernas no Peru e em evidências contidas em escritos arqueológicos encontrados na região ocupada pelos Maias, na América Central (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002).

A batata-doce possui dois tipos de raiz: a de reserva ou tuberosa, que constitui a principal parte de interesse comercial, e a raiz absorvente, responsável pela absorção de água e extração de nutrientes do solo. As raízes tuberosas se formam desde o início do desenvolvimento da planta, sendo facilmente identificadas pela maior espessura, pela pouca presença de raízes secundárias e por se originarem dos nós (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002).

1.1.1. Composição química da raiz de batata-doce

A composição da mandioca e da batata-doce varia muito com a espécie, idade e condições de cultivo (COUTINHO, 2007). A Tabela 1 mostra a composição da batata-doce em comparação com a da mandioca.

Tabela 1. Composição centesimal, em base seca, da mandioca e batata-doce.

	Mandioca ¹	Batata-doce ²
Amido (%)	90,1	83
Proteína (%)	1,5	2,9
Fibra (%)	5,6	3,8
Gordura (%)	0,3	0,8
Açúcares (%)	0,7	7,8
Cinzas (%)	1,8	1,7

Fontes: ¹ Mendes (1992), ² Kohyama; Nishinari (1992).

A batata-doce apresenta um pigmento, o beta-caroteno, e outros, carotenos e xantofilas (violxantina) em quantidades menores. Quando as batatas-doces são processadas ou seus produtos estocados em ambientes com grande concentração de oxigênio, ocorre a perda de caroteno (BOUWKAMP, 1985).

A batata-doce na colheita contém entre 16 e 40% de massa seca. Dessa massa, 75 a 90% são carboidratos compostos por açúcar, amido, celulose, pectina e hemicelulose. A sacarose é o açúcar mais abundante na batata-doce crua, com pequena quantidade de glicose e frutose (BOUWKAMP, 1985).

1.1.2. Composição do amido

O amido é a principal reserva de alimento dos vegetais; ele ocorre como grânulos microscópicos nas raízes, nos tubérculos e nas sementes dos vegetais. Milho, batatas, trigo e arroz são fontes comerciais importantes do amido. Aquecer o amido com água faz com que os grânulos se inchem, produzindo uma suspensão coloidal, da qual dois principais componentes podem ser isolados. Uma fração é chamada *amilose*

e a outra *amilopectina*. A maioria dos amidos rende 10-20% de amilose e 80-90% de amilopectina (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

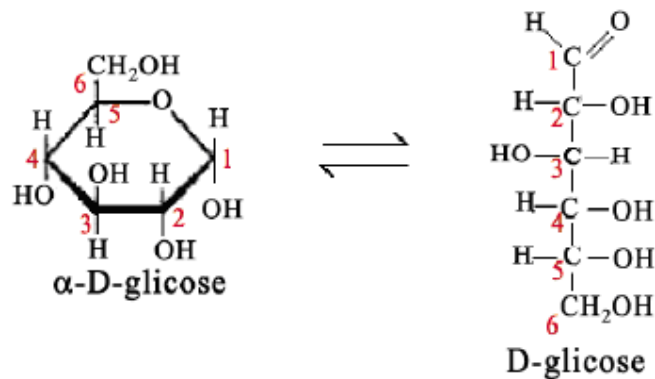


Figura 1. Molécula de glicose. Fonte: Surmely; Alvarez; Cereda; Vilpoux (2001).

Medidas físicas mostram que a amilose consiste tipicamente em mais de 1000 unidades de D-glicopiranosídeo, conectados com ligações α entre C1 de uma unidade e C4 da unidade seguinte, como mostra a figura 2 (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

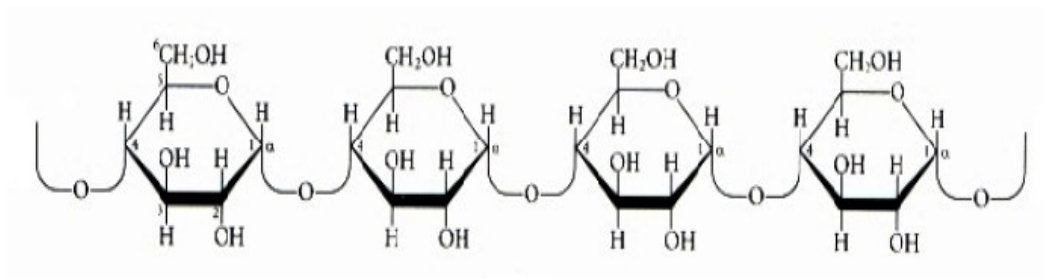


Figura 2. Ligações $\alpha(1,4)$ da molécula de amilose. Fonte: Nelson; Cox (2002).

A amilopectina possui uma estrutura semelhante àquela da amilose, com a exceção de que na amilopectina as cadeias são ramificadas. As ramificações ocorrem entre o C6 de uma unidade de glicose e o C1 de uma outra e ocorrem nos intervalos de 20-25 das unidades da glicose, como mostra a figura 3 (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

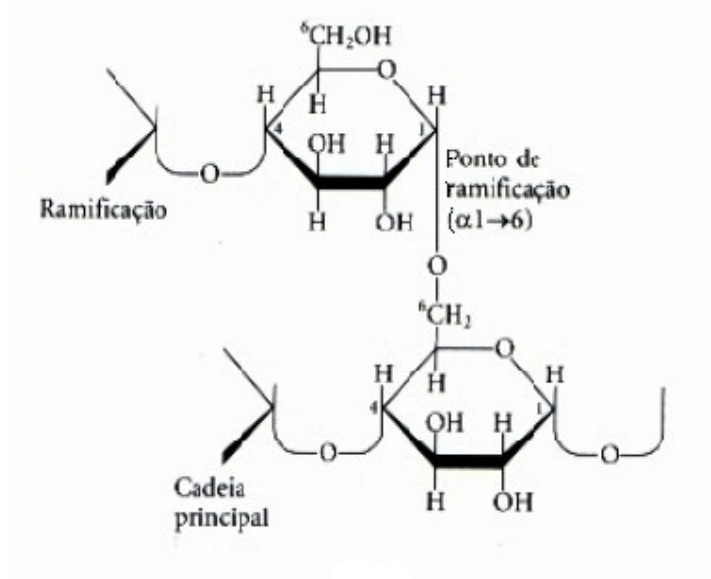


Figura 3. Ligações $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$ da molécula de amilopectina. Fonte: Nelson; Cox (2002).

Além da amilose e amilopectina, os grânulos de amido também contêm umidade, lipídios, proteínas e minerais (KEARSLEY; DZIEDZIC, 1995).

1.1.3. Produção e mercado consumidor

No Brasil, as amiláceas tropicais com grande potencial na extração de amido são a mandioca e a batata-doce, a batata-doce pelo seu baixo custo de produção associado à alta produtividade de matéria seca, resulta em maior impacto da sua utilização na agroindústria, em relação aos seus principais competidores como o milho e a mandioca (COUTINHO, 2007).

O cultivo da batata-doce é exercido com pouco uso de tecnologia, obtendo-se baixos índices de produtividade e baixa qualidade dos produtos (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2005).

Entretanto, a cultura da batata-doce é uma lavoura de grande importância social, contribuindo para o suprimento alimentar das populações mais pobres. Comparada com culturas como arroz, banana, milho e sorgo, a batata-doce é mais

eficiente em quantidade de energia produzida por unidade de área e por unidade de tempo. Isso ocorre porque produz grande volume de raízes em um ciclo relativamente curto, a um custo baixo, durante o ano inteiro (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2005).

A batata-doce é cultivada em 111 países, sendo que aproximadamente 90% da produção é obtida na Ásia, 5% na África e 5% no restante do mundo. Apenas 2% da produção estão em países industrializados. A China destaca-se como o maior produtor atingindo 100 milhões de toneladas/ano (FAO, 2001).

A cultura adapta-se melhor em áreas tropicais onde vive a maior proporção de populações pobres. Nessas regiões, além de constituir alimento humano de bom conteúdo nutricional, principalmente como fonte de energia e de proteínas, a batata-doce tem grande importância na alimentação animal e na produção industrial de farinha, amido e álcool. É considerada uma cultura rústica, pois apresenta grande resistência a pragas, pouca resposta à aplicação de fertilizantes, e cresce em solos pobres e degradados (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2005).

No Brasil, a batata-doce é cultivada em todas as regiões. Embora bem disseminada no país, está mais presente nas regiões Sul e Nordeste, notadamente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco e Paraíba (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2005).

Além da resistência à seca, segundo Silva; Lopes; Magalhães (2005) a cultura apresenta as seguintes características:

- Fácil cultivo - Embora existam diversas técnicas aplicadas desde o preparo do solo até o processamento pós-colheita, a cultura pode ser conduzida de forma rudimentar, sem utilização de fertilizantes, agrotóxicos ou irrigação.

- Tem baixo custo de produção – Ao se comparar com diversas outras hortaliças, a batata-doce demanda menos fertilizantes, irrigação e mão-de-obra, o que resulta em baixo custo relativo de produção.
- Permite colheita prolongada – A parte comercial se constitui de raízes de reserva que se formam ao longo do ciclo da planta, sem apresentar um momento específico de colheita, tratando-se portanto de uma planta de ciclo perene. Assim sendo, a colheita pode ser parcelada, antecipada, ou retardada, de acordo com a conveniência do produtor, levando-se em conta, porém, que a antecipação corresponde à produção de raízes de menor tamanho e que o retardamento implica em maior incidência de pragas, além da formação de raízes acima dos padrões comerciais.
- Apresenta resistência a pragas e doenças – O fato da batata-doce ter sido uma das hortaliças mais cultivadas em períodos quando não se utilizavam agrotóxicos, é um comprovante de sua resistência natural a pragas e doenças.
- É mecanizável – A horticultura é uma atividade que geralmente consome grande quantidade de mão-de-obra, o que favorece a fixação do homem no campo. Entretanto, o uso de serviços mecanizados reduz o custo de produção e aumenta a possibilidade de lucro para o produtor.

A despeito dessas características, a cultura apresenta uma série de desvantagens ou barreiras:

- É de difícil preparo para a culinária.
- Tem aparência ruim.
- Forma manchas devido ao látex.

Uma das conseqüências destes entraves é a restrição na comercialização. O volume de venda nos supermercados e nos atacadistas é relativamente pequeno. O maior volume de vendas ocorre em mercados de periferia, como as feiras e quitandas, que é individualmente pequeno, formando-se então um ciclo vicioso de baixa qualidade do produto, baixo valor pago ao produtor, pouco investimento, baixo nível tecnológico (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2005).

1.2. Uso de fontes amiláceas para produção de etanol

O amido é fonte de carbono em muitos processos fermentativos inclusive na produção de etanol para fins industriais. Porém este não é assimilado diretamente pelas leveduras, sendo necessária uma hidrolise e posterior sacarificação desta matéria-prima, para obtenção de glicose, maltose e outros açúcares assimiláveis pelo microorganismo (BRINGHENTI, 2004).

Uma das fontes amiláceas que foi vista como tendo potencialidades para ser usada na fermentação etanólica foi a mandioca, inclusive na produção de álcool carburante, entretanto, no Brasil a cana de açúcar tem se apresentado como um concorrente com significativo baixo custo de produção (BRINGHENTI, 2004).

Atualmente, pensar em álcool carburante de fontes amiláceas é inviável, principalmente em comparação ao processo a partir de cana-de-açúcar e o eficiente uso do bagaço gerado. Todavia, a possibilidade de se produzir álcool fino a partir de resíduo amiláceo de farinhas, tem se mostrado bastante interessante para os industriais da área, pois este produto apresenta um maior valor de mercado que o álcool carburante, enquanto que a fonte de carbono praticamente não apresenta custo (BRINGHENTI, 2004).

1.3. Hidrólise do amido

A hidrólise da molécula de amido quebra as ligações glicosídicas progressivamente, gerando cadeias mais curtas de dextrina, maltose e glicose. No processo de hidrólise, além de água, há necessidade de agentes químicos ou enzimáticos capazes de catalisar a quebra das ligações glicosídicas, além da temperatura. (SUMERLY; ALVAREZ, 1997).

Durante a hidrólise do amido eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade da molécula do substrato. A velocidade de hidrólise depende do tipo (linear ou ramificada) e da extensão da cadeia: as ligações α -1,4 se hidrolisam mais facilmente que as ligações α -1,6, porém a maltotriose, e especialmente a maltose hidrolisa-se mais lentamente que os oligossacarídeos (NOVO, 1995).

1.4. Enzimas amilolíticas

Além do amido, as enzimas são os agentes mais importantes nas reações de hidrólise. Aquelas usadas no processo de hidrólise são também chamadas de diastases, ou enzimas amilolíticas. São compostos de natureza protéica que atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram essas reações por ativação específica (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólise (hidrolases) e mais particularmente, à categoria das enzimas que catalisam as reações de amido (MERCIER, 1985).

Enzimas que quebram indiferentemente as ligações glicosídicas no interior da molécula são chamadas de endoenzimas (α -amilase, pululanase). Por outro lado, são chamadas de exoenzimas (α -amilase, amiloglicosidase, CGTase) aquelas que hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não redutora (ABUJAMRA, 2009).

1.4.1. Ação da α -amilase

Todas as α -amilases são cálcio-metaloenzimas havendo no mínimo um átomo deste metal por molécula. Em presença de cálcio, as α -amilases são mais resistentes à valores extremos de pH, temperatura, tratamento com uréia e ao ataque de enzimas proteolíticas (GRAEL, 1989).

A enzima α -amilase é encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais. Das numerosas bactérias e fungos de onde podem ser isoladas as amilases, os mais estudados e utilizados industrialmente são *Bacillus* e *Aspergillus sp.* (COUTINHO, 2007).

A enzima α -amilase de maior utilização comercial para a hidrólise do amido é a Termamyl 120 L. Esta é um preparado enzimático líquido e concentrado, a base de α -amilase termoestável, produzida a partir de cepa de *Bacillus licheniformes*. Termamyl foi especialmente desenvolvido para promover a liquefação (dextrinização) do amido e produção de maltodextrinas (SURMELY; ALVAREZ; CEREDA; VILPOUX, 2001). A ficha técnica desta enzima é:

▪ Aplicações:

- Indústria alimentícia: açúcares, álcool, bebidas e cerveja.
- Indústria de fermentação: vitaminas, aminoácidos, antibióticos, etc.
- Indústria têxtil e adesivos.

▪ Propriedade segundo o fornecedor:

- Atividade: 120 KNU / g (1 KNU: quantidade de enzima que hidrolisa 5,26g de amido por hora, avaliado pelo método *standard* da Novozymes A/S).

▪ Parâmetros ótimos:

- pH: 6 – 8.

- Temperatura: 90 – 105°C.
- Cálcio: 30 – 60 mg/kg.

Fonte: Surmely; Alvarez; Cereda; Vilpoux (2001)

1.4.2. Ação da amiloglucosidase

A amiloglucosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações do tipo α -1,4 e α -1,6. A ação da amiloglucosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (FUGII et al., 1988).

A AMG 300L é uma amiloglucosidase de grau alimentício, produzido a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*. Durante a hidrólise, eliminam-se gradualmente as unidades de glicose da extremidade não redutora do sacarídeo. A velocidade de hidrólise depende do tipo de ligação e do comprimento da cadeia. A AMG é recomendada para sacarificação do amido na produção de glicose (SURMELY; ALVAREZ; CEREDA; VILPOUX, 2001). A ficha técnica desta enzima é:

▪ Aplicações:

- Indústria alimentícia: açúcares, álcool, bebidas e cerveja.
- Indústria de fermentação: vitaminas, aminoácidos, antibióticos, etc.
- Indústria de fermentação.

▪ Propriedade segundo o fornecedor:

- Atividade: 120 AGU / g. A AMG é disponível com atividade de 300 e 100 AGU/g. (1 AGU: concentração de enzima que hidrolisa um micromol de maltose por minuto, segundo o padrão da Novozymes A/S).

• Parâmetros ótimos:

- pH: 4 – 4,5.
- Temperatura: 58 – 70°C.

Fonte: Surmely; Alvarez; Cereda; Vilpoux (2001)

1.5. Fermentação etanólica

A fermentação é uma transformação bioquímica provocada num substrato por fermento vivo ou por princípio ativo extraído deste fermento. O setor alcooleiro no Brasil, utiliza-se de leveduras do gênero *Saccharomyces*, predominantemente a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e suas diversas linhagens. Nas grandes indústrias produtoras de etanol são usadas leveduras de panificação prensadas e secas, ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (BELLUCO, 2001).

Segundo Ribeiro et al. (1987), as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo fermentativo, as quais influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool. As leveduras são capazes de assimilar, mono, di e trissacarídeos e como são aeróbio facultativas, os produtos finais da metabolização dos açúcares irão depender das condições ambientais em que ela se encontra. Uma fração do açúcar, é transformado em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose (fermentação alcoólica).

1.6. Destilação

Após a fermentação, os meios açucarados passam a denominar-se vinhos, com uma constituição variável, mas encerrando sempre substâncias gasosas, sólidas e líquidas. As primeiras representam-se principalmente pelo dióxido de carbono, que se dissolve em pequena proporção. Os sólidos se fazem presentes pelas células das

leveduras alcoólicas, de bactérias contaminantes, sais minerais, açúcares não fermentados e impurezas sólidas em suspensão (LIMA et al, 2001).

Os líquidos mais importantes são água e o etanol, em porcentagens que variam de 88 a 93% e 12 a 7%, respectivamente, nos vinhos comuns (LIMA et al, 2001).

Desse material impuro e heterogêneo, separa-se o etanol por destilação, em grau de pureza e concentração variáveis. Nessa operação, geram-se vapores de álcool e água, que depois de resfriados formam um líquido de concentração superior a do vinho e isento de substâncias sólidas. (LIMA et al, 2001).

A tecnologia da destilação, independentemente do tipo de aparelho, influi decisivamente na constituição e no teor do coeficiente não-álcool. As destilações lentas produzem um destilado com melhores características organolépticas, com mais ésteres, menos acidez e menos álcoois superiores. A destilação altera a composição do destilado não só pela proporção relativa dos compostos, mas também pelas reações químicas que ocorrem durante o aquecimento (RIJKE; TERHEIDE, 1983).

1.7. Álcool etílico

A tecnologia de produção de álcool nos permite basicamente a existência de duas classes de produto; i) álcool etílico hidratado, e , ii) álcool etílico anidro ou absoluto, cujas especificações, são definidas segundo as aplicações a que é destinado. Como todo produto, o álcool etílico pode conter alguma substância residual de onde foi extraído, advindo daí a necessidade de purificá-lo ao grau necessário a sua aplicação, entendendo-se então que quanto mais nobre seja a aplicação mais requisitos de qualidade são aplicáveis (BRINGHENTI, 2004).

O álcool etílico hidratado é utilizado em várias aplicações, sendo as mais comuns o chamado uso potável, alimentício e farmacêutico: fabricação de bebidas (vodka, gim, licores, etc.), vinagre, alimentos (precipitante, solvente, etc.), solvente de aromas (aromatizante) na fabricação de alimentos e cigarros, na extração de produtos medicinais de plantas e tecidos animais, na fabricação de vacinas, antibióticos e preparações em geral, anti-séptico, etc.; Em cosméticos; para fabricação de perfumes, desodorantes, cremes, etc. Ou ainda em usos menos nobres como o industrial; fabricação de detergentes; produtos de limpeza; tinturas; têxteis; pinturas; solventes; combustível; aplicações especiais, etc (BRINGHENTI, 2004).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de produção de hidrolisado enzimático de amido de batata-doce para produção de etanol, avaliando a influência da concentração da matéria seca e a qualidade do destilado produzido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria prima:

Para o desenvolvimento desta pesquisa a matéria prima utilizada foi a batata-doce, adquirida comercialmente.

3.1.1. Produção da farinha de batata-doce:

A produção da farinha foi realizada da seguinte maneira: Inicialmente a batata-doce foi fatiada em uma máquina caseira, as fatias foram colocadas em um telado a um metro do chão, em exposição ao sol, até a secagem. Este processo ocorreu em aproximadamente cinco dias. Após a secagem a batata-doce fatiada e seca, foi moída em um moinho de martelo, obtendo então a farinha de batata-doce.

3.2. Caracterização da farinha de batata-doce:

As análises físico-químicas da farinha de batata-doce foram realizadas no Laboratório de Análises do Centro de Raízes e Amidos Tropicais CERAT/UNESP. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

As análises foram: teor de umidade (%), pH, cinzas (%), proteínas (%), matéria graxa (%), fibras (%), açúcares solúveis totais (%), amido (%) e acidez titulável, empregando metodologias da AOAC (Association of Official Analytical Chemistry)1980.

3.3. Preparo do hidrolisado:

A preparação do hidrolisado, utilizado como fonte de carboidrato da fermentação alcoólica, necessitou-se a aplicação de processo térmico e ação de enzima

amilolítica que transformou os amidos em açúcares redutores. Esta reação enzimática ocorreu em duas etapas sendo a dextrinização e a sacarificação.

Para realização dos ensaios, foram preparados 12 litros de suspensões de farinha de batata-doce com concentrações de 10, 15 e 20 % em base seca.

3.3.1. Etapa de dextrinização:

A enzima utilizada para liquefação do amido foi a α -amilase Termamyl 120L, é termoestável e sua faixa de atuação de 90 a 110°C e pH 6,0. O tempo da reação foram duas horas e a quantidade de enzima foi de 1 KNU por grama de amido na suspensão, sendo que o KNU é a unidade de atividade enzimática da enzima, conforme indicação do fabricante. Sendo que 120 KNU corresponde a 1 ml de enzima.

Foram coletadas amostras no reator nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos de processo.

3.3.2. Etapa de sacarificação:

Na etapa de sacarificação a enzima utilizada foi a amiloglucosidase AMG 300L, utilizada para produzir glicose a partir da solução de amido previamente dextrinizada na etapa anterior.

Esta enzima é termoestável (55–60°C) em soluções acidificadas (pH 4,0-5,5) (PIMENTEL, 1987). O tempo de reação foi de aproximadamente 17 horas e a quantidade adicionada foi de 1 KNU/g de amido, sendo que 300 KNU correspondem a 1 ml de enzima.

Durante o processo de hidrólise, amostras foram coletadas no reator nas primeiras quatro horas e ao fim às 19 horas, para posteriores análises. O hidrolisado final foi separado do resíduo ligno celulósico por filtração.

3.4. Fermentação alcoólica:

Após a filtração do hidrolisado, um volume de quatro quilos do filtrado foram transferidos e preparados para a fermentação.

Primeiramente ajustou-se o pH para 4,5 e transferiu-se para erleynmeyer de 6 litros. Foi inoculado o catalisador biológico, leveduras do gênero *saccharomyces cerevisiae* desidratadas da cepa CAT 1 numa proporção de 5 % em massa.

Para o processo de fermentação alcoólica foi utilizado um agitador orbital modelo Shacker da marca Superohm, com temperatura controlada de 30°C, velocidade de 120 rpm por um período de 15 horas.

Após o término da fermentação, a levedura foi separada do vinho por centrifugação.

3.5. Destilação:

A destilação foi realizada em coluna de vidro com refluxo onde, foram adicionados 750 ml do vinho em balão de fundo redondo, a temperatura manteve-se entre 78 a 83°C e destilando-se até a abtenção de 40 ml de álcool.

O teste de Barbet foi realizado utilizando 5 ml de álcool e 0,5 ml de permanganato de potássio, em banho de 15°C, até que houvesse a mudança de cor.

O diagrama abaixo mostra as duas etapas da hidrólise, os processos para a produção do álcool e as análises realizadas.

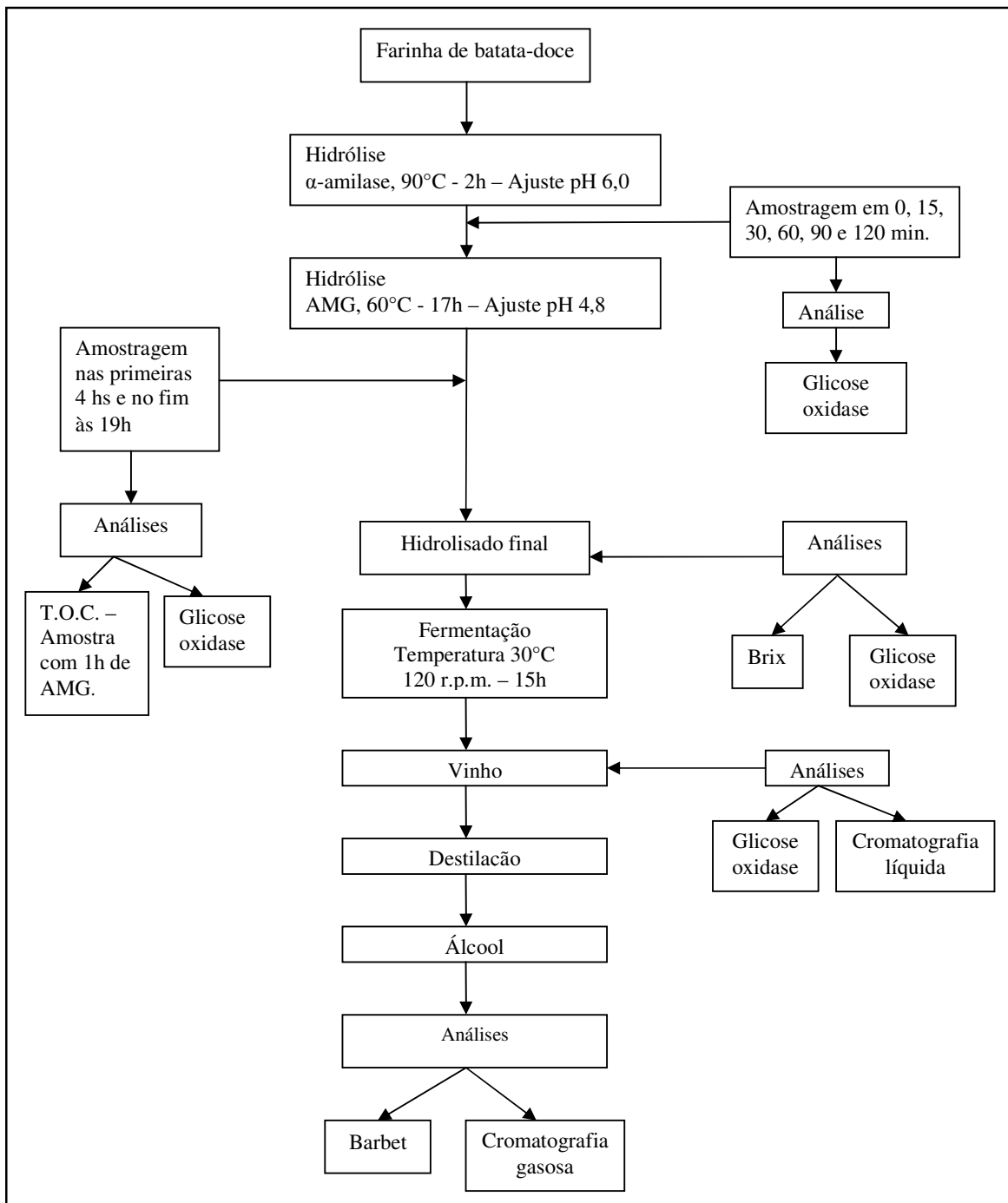


Figura 4 – Diagrama indicativo das etapas do processo de hidrólise realizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização físico-química da farinha de batata-doce utilizada nos ensaios está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações em valores médios das análises centesimais realizadas na farinha de batata-doce e valores correspondentes de batata-doce *in natura*, observado na literatura.

Análises	Farinha de batata-doce	Batata-doce ¹ % m.s. (<i>in natura</i>)
Umidade %	11,02	11,06
Cinzas %	3,07	0,35
Acidez (mLNaOH/100g)	7,16	-
Matéria graxa %	0,57	0,11
Proteína %	5,59	0,35
Fibras %	1,68	0,32
Amido %	86,07	95,56
Açúcares Redutores	1,92	0,27
pH	6,49	5,55

Fonte: ¹ Coutinho (2007)

Os amidos de tuberosas amiláceas apresentam baixos teores dos constituintes menores, tais como: lipídeos, proteínas, cinzas, fibras, açúcares, e um alto teor de amido (COUTINHO, 2007). A somatória dos constituintes menores no amido da farinha de batata-doce foi de 12,8% e na batata-doce *in natura* conforme a tabela, este valor é de 1,4%, sendo que, o teor de amido encontrado na farinha de batata-doce é semelhante ao valor obtido por Leonel e Cereda (2002), que foi de 85%.

Durante o processo de hidrólise amostras foram retiradas em diferentes tempos para observar a produção de glicose a partir do amido. Na tabela abaixo estão os resultados nos três ensaios realizados, e nos diferentes tempos.

Tabela 3 – Concentrações em valores médios da análise de glicose em mg/dL nas amostras retiradas em tempos diferentes durante o processo de hidrólise.

Tempo de hidrólise (hora)	Ensaio 10% (m.s.) (mg/dL)	Ensaio 15% (m.s.) (mg/dL)	Ensaio 20% (m.s.) (mg/dL)
(1° enzima)			
0	600	900	800
0,25	1400	1400	1500
0,5	2500	4000	5500
1,0	-	-	5600
1,5	5400	5400	5800
2,0	6200	5000	5200
(2° enzima)			
0	6600	7300	11500
1,0	8000	8500	12700
2,0	8500	8500	13300
3,0	9000	10900	13800
4,0	9100	9500	15200
19,0	11200	13500	17500

O gráfico correspondente à Tabela 3, é o da formação de glicose em função do tempo de hidrólise.

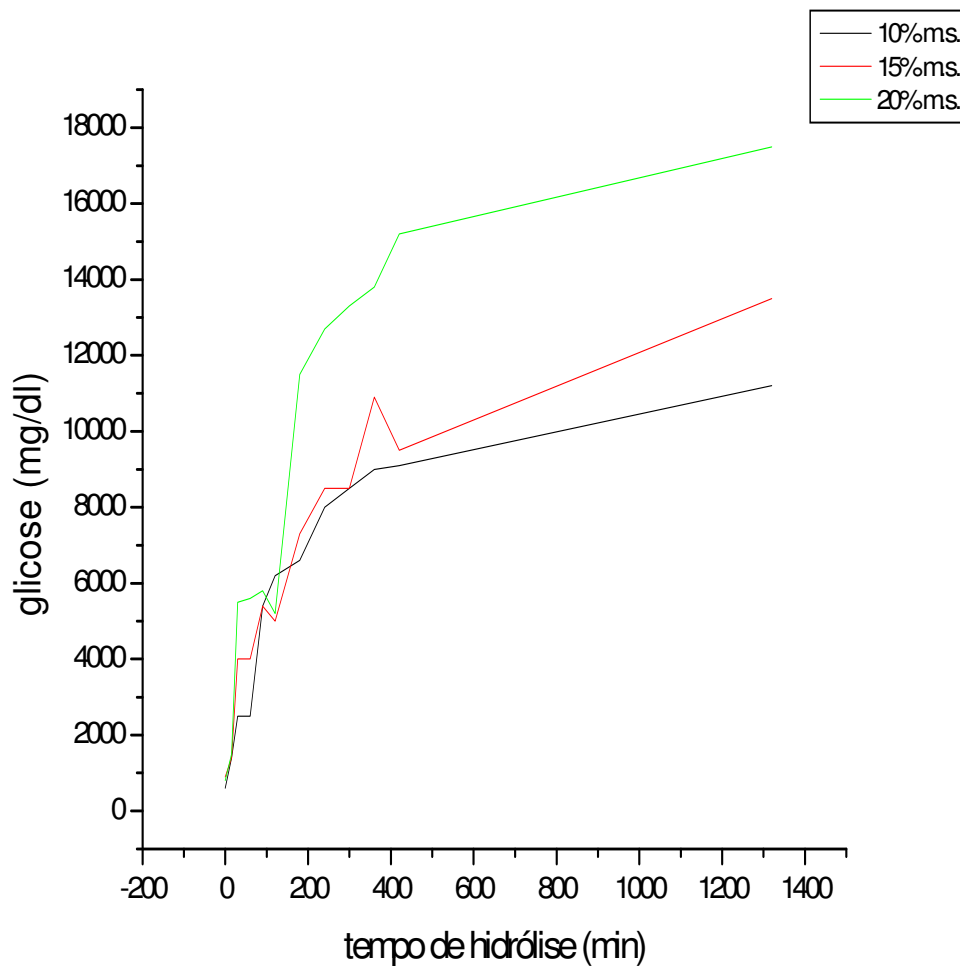


Figura 5 – Gráfico da formação de glicose em função do tempo de hidrólise nos ensaios com 10, 15 e 20% m.s.

Como se observa no gráfico, a maior produção de açúcar ocorreu no ensaio com 20% de matéria-seca, nos ensaios com 10 e 15% m.s. não houve uma diferença significativa.

Segundo Abujamra (2009), a formulação de suspensões para a etapa de hidrólise demonstraram que suspensões com altas concentrações de batata-doce não eram viáveis, pois, com o aquecimento a suspensão tornava-se rapidamente pastosa

interferindo diretamente na ação das enzimas, após alguns ensaios obteve-se sucesso com suspensões contendo 11% de matéria seca com a batata doce *in natura*.

No processo com a farinha de batata-doce não foi observado o mesmo, mostrando que a enzima agiu normalmente e que quanto maior a concentração, maior foi a produção de glicose a partir do amido.

Na tabela abaixo estão os resultados da glicose oxidase e do Brix realizados no hidrolisado final.

Tabela 4 – Concentrações em valores médios das análises realizadas no hidrolisado.

Análises	Ensaio 10% (m.s.)	Ensaio 15% (m.s.)	Ensaio 20% (m.s.)
Glicose (mg/dL)	11200	13500	17500
Brix (°)	11,5	17,0	21,75

Os valores indicaram um eficiente ação das enzimas amilolíticas na hidrólise do amido, contidos na batata-doce.

Durante o processo de hidrólise uma amostra foi retirada com uma hora de reação com a segunda enzima, a amiloglucosidase, esta foi injetada no T.O.C., que calcula a quantidade de carbono elementar presente na amostra, os resultados estão na tabela abaixo:

Tabela 5 – Concentrações em valores médios do T.O.C das amostras retiradas durante a hidrólise, em uma hora de reação com a amiloglucosidase.

Ensaio	Resultado em p.p.m.	Correspondentes valores de glicose
10 % m.s	36925	9,22%
15% m.s.	55200	13,8%
20% m.s.	72225	18,1%

A quantidade de carbono existente no amido antes da hidrólise é a mesma quantidade existente na glicose após a hidrólise, só após a fermentação é que há perda, pois além do álcool formado pela fermentação, também há produção de gás carbônico e é neste processo que há perda de carbono para o ambiente.

Após o processo fermentativo, o vinho produzido foi submetido a análise para determinação da concentração de glicose, para verificar se toda a glicose produzida no hidrolisado foi fermentada e transformada em álcool. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos:

Tabela 6 – Concentrações de glicose no vinho após a fermentação.

Ensaio	Resultado em mg/dL
10% m.s.	3,57
15% m.s.	169,64
20% m.s.	321,42

Como se observa, não restou uma quantidade significativa de glicose sem ser transformada em álcool, este resultado demonstra que a fermentação foi eficiente.

Após a fermentação, realizou-se cromatografia líquida no vinho para identificar os compostos presentes, abaixo estão listados os compostos e as porcentagens dos mesmos:

Tabela 7 – Porcentagem dos compostos identificados no vinho por cromatografia líquida nos diferentes ensaios.

Compostos	10%	15%	20%
Glicose	-	0,29	0,70
Glicerol	0,61	1,02	1,87
Metanol	-	0,20	0,15
Etanol	2,16	4,39	6,03

Na Tabela 8, estão os resultados obtidos a partir da cromatografia gasosa no álcool produzido:

Tabela 8 – Porcentagem dos compostos identificados no álcool pela cromatografia gasosa nos diferentes ensaios.

Compostos	10%	15%	20%
Metanol	0,64	1,64	1,43
Etanol	22,36	43,42	46,76
Acetona	0,63	1,00	1,08
Iso-propanol	0,33	0,99	1,24
Acetato de etila	0,21	0,61	0,80
Isoamílico	0,32	1,03	1,28
Amílico	0,10	0,63	0,81

A análise de Barbet foi realizada, para saber o tempo do ponto de viragem do álcool produzido, sendo que quanto maior o tempo, maior a pureza do álcool. Como se observa na tabela abaixo o álcool com 20% m.s. teve um melhor resultado.

Tabela 9 – Valores da análise de Barbet em amostras de etanol originários dos ensaios.

Ensaio	Resultado em segundos
10% m.s.	12
15% m.s.	23
20% m.s.	33

Os resultados indicaram que a amostra de álcool destilada apresenta altas concentrações de substâncias redutoras que fazem com que o permanganato do reagente de Barbet se oxide e indique saturação mudando de cor.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- A variação da concentração de matéria seca nos hidrolisados enzimáticos teve grande influência sobre o processo na produção de etanol.
- No ensaio de 20% m.s. se obteve um melhor resultado, pois além de se produzir um álcool com maior rendimento, também se produziu um álcool mais puro.
- A maior concentração de m.s. no ensaio a 20%, não produziu um hidrolisado com viscosidade que interferisse na ação das enzimas amilolíticas.

6. BIBLIOGRAFIA

AOAC. Association of Official Agricultural Chemistry. **Official Methods of Analysis**. 13.ed. Washington: s.n., 1980. 109p.

BELLUCO, A. E. S. **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisie* sob condições não proliferantes**. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. Piracicaba, 2001.

BOUWKAMP, J.C. **Sweet Potato Products: A Natural Resource for the Tropics**. Florida: Library of Congress Cataloging, 1985, Parte II: Utilization: p.137-259.

BRINGHENTI, L. **Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca**. 2004. Tese para obtenção do título de mestre em Agronomia - Energia na Agricultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu.

ABUJAMRA, L. B. **Produção de destilado alcoólico a partir de mosto fermentado de batata-doce**. 2009. Tese para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de concentração em energia na agricultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p.1-6; 80-82; 146-151.

COUTINHO, A. P. C. **Produção e caracterização de maltodextrinas a partir de amidos de mandioca e batata-doce**. 2007. Tese para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de concentração em energia na agricultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu.

FAO **Statistical Database**, do ano de 2001. Disponível em <http://www.fao.org> > Acesso em: 18 agosto 2004.

FUJII, M.; HOMMA, T.; TANIGUCHI, M. Synergism of α - amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. **Biotechnol. Bioeng.** , v. 32, p. 910 - 15, 1988.

GRAEL, E. T.; MENEZES, T. J. B. Produção de α -amilase: características morfofisiológicas de *B. amyloliquefaciens* visando melhoramento genético. **Colet. Inst. Tecnol. Aliment.**, v.19, n. 1, p.70-6, 1989.

KEARSLEY, M. W.; DZIEDZIC, S. Z. **Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives**. Blackie Academic & Professional, Glasgow. 275p. 1995. ISBN 0751402699.

KOBYAMA, K.; NISHINARI, K. Cellulose derivatives effects on gelatinization and retrogradation of sweet potato starch. **Journal of Food Science**, v.57, n.1, p.128-131, 1992.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.65-69, 2002.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol . In: **Biotecnologia**. São Paulo: E. Blucher, 2001, v. 3, p. 1- 43.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZONI, W.; SCHIMIDELL, W. Processos Fermentativos In : **Biotecnologia Industrial Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, 2001, v. 3, p. 90-122.

MENDES, B. A. **Obtenção, caracterização e utilização de puba como matéria-prima na produção de etanol**. Campinas, 1992. 176p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MERCIER, C. Les enzymes amylolytiques. In : MOURANCHE, A; COSTES, C. Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d'intérêt industriel. Paris : Ed. Gauthier-Villars-Bordas, 1985. p. 109-142.

NELSON, L. D.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo, 2002.

NOVO Enzyme Process Division, Fichas técnicas, 1995, NOVO Nordisk Boindustrial do Brasil Ltda.

NOVOZYMES A/S. Ficha técnica do produto. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acesso em: 17 mar. 2003.

PIMENTEL, I. C. **Enzimas amilolíticas e proteolíticas**. Piracicaba: Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP, 1987. 52p. (mimeogr.)

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J. C.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 105, n. 1, p. 26-30, 1987.

RIJKE, R. de; HEIDE, R. Flavour compounds in rum, cognac and whisky. In: PIGGOTT, J. R. (Ed.) **Flavour of distilled beverages: Origin and development**. Florida: Verlag Chemie International, INC., 1983. p.79-92. (Ellis Horwood series in food science and technology)

SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico** 2005. Tese para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de concentração em energia na agricultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. Embrapa, **Produção de Batata doce**. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batata doce/index.htm>> Acesso em 10 out. 2009.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**, v. 2, 7. ed. Rio de Janeiro, 2002

SURMELY, R. H.; ALVAREZ, H. **Hidrolisados de amido no Brasil e sua produção**. Botucatu; Centro de Raízes Tropicais, 1997. 49 p.

SURMELY, R. H.; ALVAREZ, H.; CEREDA M. P.; VILPOUX, O., et al. **Hidrólise do amido**. São Paulo. Fundação Cargil, 2001. p. 377-448.