
Ciências Biológicas

THOMAZ HENRIQUE MARRA DE JESUS

**APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE
EXTRAÇÃO DE FÉCULA DE MANDIOCA PARA
A PRODUÇÃO DE ETANOL**



Rio Claro - SP
2022

THOMAZ HENRIQUE MARRA DE JESUS

**APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE FÉCULA DE
MANDIOCA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Marin Morales

Co-orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Rio Claro - SP

2022

J58a

Jesus, Thomaz Henrique Marra de

Aproveitamento do resíduo de extração de fécula de mandioca para a produção de etanol / Thomaz Henrique Marra de Jesus. -- Rio Claro, 2022

27 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Eduardo Marin Morales

Coorientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Fermentação. 2. Hidrólise. 3. Amido. 4. Mandioca. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

THOMAZ HENRIQUE MARRA DE JESUS

APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE FÉCULA DE MANDIOCA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

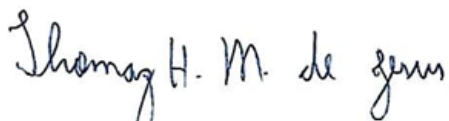
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo Marin Morales (orientador)

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Profa. Dra. Antônia Marli dos Santos

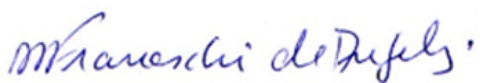
Aprovado em: 16 de novembro de 2022



Assinatura do discente



Assinatura do(a) orientador(a)



Assinatura do(a) coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso contou com a ajuda de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

Aos meus pais, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiou o meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Eduardo Marin Morales, por ter sido meu orientador, e pelas correções e ensinamentos que permitiram que eu pudesse concluir este trabalho.

À Dra. Dilza Nalin pelo apoio, disposição e ótimas dicas durante todo o período de desenvolvimento do projeto.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, com o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O Brasil é o quarto país dentre aqueles que produzem mandioca (*Manihot esculenta*). A mandioca é utilizada como alimento no mundo todo e parte da produção agrícola é industrializada. Como alimento é consumida sob diferentes formas sempre após a cocção, uma vez que possui componentes cianogênicos termolábeis. Quando industrializada para extração do amido, gera grande porção de resíduo na forma de bagaço, este ainda contendo parte considerável de amido. Parte do bagaço é transformado em ração para animais e outra porção é descartada. Frente às diretrizes mundiais de evitar a contaminação ambiental, este trabalho teve como intuito avaliar a possibilidade de aproveitar o amido residual do bagaço para produção de etanol, mediante a hidrólise enzimática. Os resultados obtidos permitiram concluir que as enzimas presentes no malte de cevada são suficientes para hidrolisar completamente o amido presente no bagaço de mandioca, desde que antes do processo da hidrólise propriamente dita, seja feito o aquecimento do material até a ebulição, para que os grânulos de amido sejam rompidos e ocorra a gelatinização, otimizando o acesso das enzimas hidrolíticas ao seu substrato. O maior grau de teor alcoólico que foi alcançado foi de 3,4%, utilizando malte e bagaço numa proporção 1:1, a 10% peso/volume.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*; bagaço de mandioca; malte; hidrólise enzimática; fermentação.

ABSTRACT

Brazil is the fourth country among those that produce cassava (*Manihot esculenta*). Cassava is used as food all over the world and part of the agricultural production is industrialized. As food, it is consumed in different ways, always after cooking, since it has thermolabile cyanogenic components. When industrialized for starch extraction, it generates a large portion of residue in the form of bagasse, which still contains a considerable amount of starch. Part of the bagasse is transformed into animal feed and another portion is discarded. In view of the global guidelines to avoid environmental contamination, this study aimed to evaluate the possibility of using residual starch from bagasse to produce ethanol, through enzymatic hydrolysis. The results obtained show that the enzymes present in barley malt are sufficient to completely hydrolyze the starch present in cassava bagasse, provided that, before the hydrolysis process itself, the material is heated to boiling temperature, so that the granules of starch are broken and gelatinization occurs, optimizing the access of hydrolytic enzymes to their substrate. The highest degree of alcohol content that was achieved was 3.4%, using malt and bagasse in a 1:1 ratio, at 10% weight/volume.

Keywords: *Manihot esculenta*; cassava bagasse; malt; enzymatic hydrolysis; fermentation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	OBJETIVOS	5
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	Mandioca	5
3.1.1	<i>Composição do amido da mandioca</i>	7
3.1.2	<i>Hidrólise do amido de bagaço de mandioca</i>	8
3.2	Cevada	9
3.3	Leveduras e o processo fermentativo	10
4	MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1	Leveduras	10
4.1.1	<i>Levedura de cervejaria</i>	11
4.1.2	<i>Levedura da indústria alcooleira</i>	11
4.2	Malte de Cevada	11
4.3	Bagaço de mandioca	11
4.4	Equipamentos e vidraria ..	12
4.5	Análises	12
4.5.1	<i>Determinação de concentração do bagaço hidratado</i>	12
4.5.2	<i>Hidrólise do bagaço de mandioca</i>	12
4.5.3	<i>Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida</i>	13
4.5.4	<i>Avaliação de liberação de açúcar em diferentes concentrações de malte</i> ..	13
4.5.5	<i>Melhoria nutricional do bagaço de mandioca</i>	13
4.5.6	<i>Determinação de açúcares redutores totais</i>	14
4.5.7	<i>Verificação da produção de etanol e avaliação do nitrogênio total</i>	14
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
7	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A mandioca é um dos principais cultivares agrícolas do mundo, sendo a quinta cultura alimentar mais importante, onde a produção mundial em 2016 foi de 277,1 milhões de toneladas (FAO, 2016). O Brasil é o quarto maior produtor mundial, cujo destino da produção é majoritariamente o mercado interno.

O processamento industrial da mandioca é feito com o principal objetivo de produzir farinha e fécula a partir das raízes, processo este que gera grande quantidade de resíduo (principalmente o bagaço) com pouca utilidade para a indústria, que normalmente é usado na alimentação animal ou adubação. A importância de estudos que tenham como objetivo aumentar o valor econômico do bagaço de mandioca, está na possibilidade do mesmo ser visto como um subproduto com valor comercial, que pode então, ser aproveitado pela indústria, reduzindo o custo final do processo, assim como o impacto dos resíduos no ambiente, e também levando a um maior aproveitamento da área plantada.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

Geral: Procurar aproveitar o resíduo da indústria de fécula de mandioca

Específico: Tratar termicamente o resíduo, e a seguir induzir a hidrólise enzimática utilizando malte de cevada para sacarificação do amido.

Buscar aproveitar os açúcares resultantes da hidrólise enzimática mediante a adição de leveduras fermentativas visando a produção de etanol.

Verificar o teor proteico do final da fermentação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma planta tuberosa da família das *Euphorbiaceae*, cultivada em regiões tropicais e subtropicais como fonte de carboidratos, devido à sua raiz rica em amido, e é o quinto alimento básico mais produzido no mundo (atrás do milho, arroz, trigo e batata) (PARMAR, 2017).

Segundo El-Sharkawy (2007), a mandioca apresenta várias características fisiológicas que a possibilitam tolerar prolongados períodos de seca, como controle estomatal justo que reduz a perda de água, alta capacidade fotossintética, e retomada de crescimento quando água se torna disponível após um período de seca, que a tornam uma planta robusta. Além disso, a mandioca é adaptável a solos pouco férteis, resistente a pragas e doenças e possui ciclos de crescimento flexíveis. (PARMAR, 2017).

Segundo Lacerda (2009), a produção de carboidratos em mandioca é cerca de 40% maior que a do arroz e cerca de 25% superior à do milho, sendo assim a fonte mais econômica de calorias tanto para a nutrição humana, quanto para a alimentação de animais. Além disso, a extração do amido de mandioca é mais fácil em comparação a seus concorrentes, o produto final apresenta maior transparência, alta viscosidade, é inodoro e insípido (ARIENTE, 2005). Segundo Pandey (2000), 60% da produção mundial é destinada ao consumo humano.

Os maiores produtores de mandioca no mundo são, respectivamente, Nigéria, Tailândia, Indonésia, Brasil, e República Democrática do Congo (FAO, 2016). No Brasil, 50,2% da produção é destinada à alimentação animal, cerca de 33% à alimentação humana, 10% da produção é perdida, e cerca de 6% está envolvida em exportação e outros usos. O rendimento industrial nas fecularias brasileiras, definido pelo teor de amido extraído do processamento da mandioca, é em média, de 25%, existindo grandes variações entre o rendimento médio dos estados (EMBRAPA, 2003).

O processamento da mandioca para a fabricação de fécula gera três resíduos básicos: a casca da raiz de mandioca; o bagaço, composto pela fibra contida na polpa e resíduos de amido; e a manipueira, que se apresenta na forma de suspensão aquosa composta por açúcares, proteínas, células descamadas, cianetos (ácido cianídrico, cianoidrinas e glicosídeos cianogênicos), entre outros (DUARTE *et al*, 2012). Para cada tonelada de mandioca utilizada na produção de amido, cerca de 928 kg de resíduos são gerados (Fiorda et al., 2013). Apesar de grande parte do cianeto ser removido durante a extração do amido, o bagaço ainda contém quantidades significativas do composto (GLANPRACHA; ANNACHHATRE, 2016). A concentração de cianeto encontrada em bagaço de mandioca está na faixa de 0,5 a 16,6 mg/kg (GUPTA *et al*, 2010). Apenas uma pequena quantidade de glicosídeos cianogênicos é encontrada no bagaço, pois durante o processo de

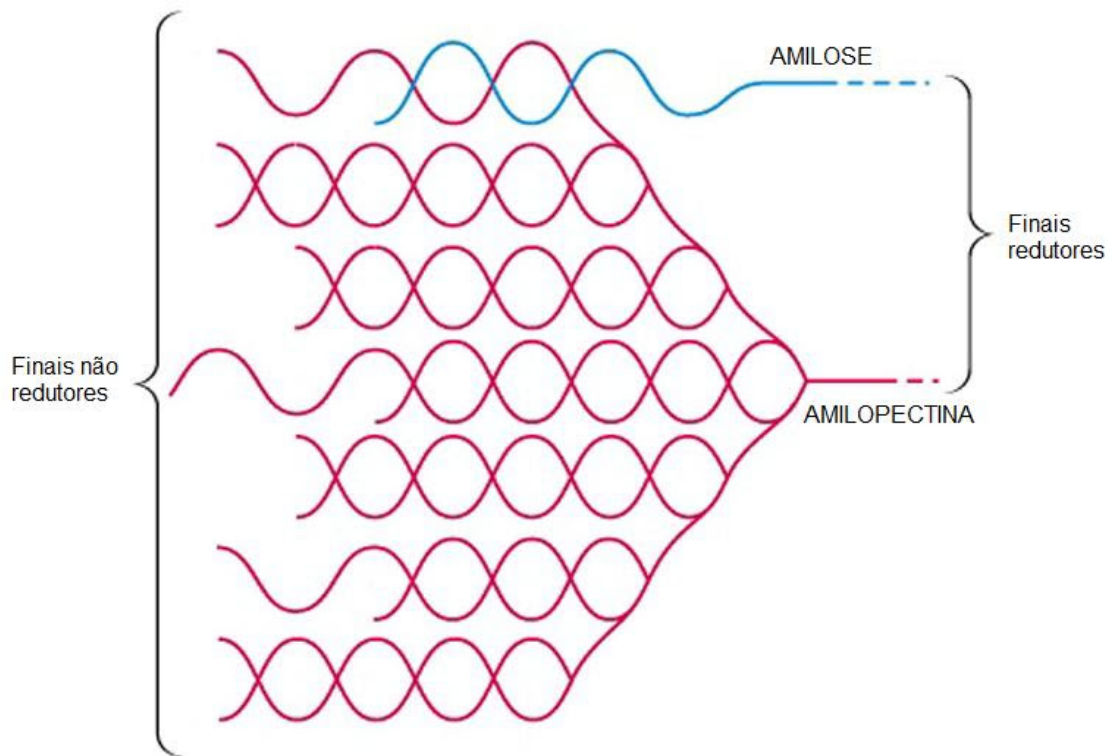
extração do amido, estes compostos são expostos à enzimas extracelulares e são hidrolisados à cianoidrinas e glicose (CUZIN; LABAT, 1992). A fermentação em estado sólido realizada por fungos comestíveis permite detoxificar substratos formulados pela mistura de bagaço de mandioca e folhas de mandioca, reduzindo o cianeto a níveis seguros para consumo, assim proporcionando um aumento no valor agregado deste resíduo agroindustrial (MORALES, 2016).

Segundo Rattanachomsri *et al.* (2009), o bagaço de mandioca pode conter até 70% de seu peso seco como amido, e foi reportado por Woiciechowski (2002) o uso de bagaço de mandioca com 66% de amido de seu peso seco. Apesar da grande quantidade de amido contido no bagaço de mandioca, seu uso pela indústria alimentícia é limitado devido à presença de substâncias como o cianeto (GLANPRACHA; ANNACHHATRE, 2016). A casca e o bagaço são principalmente destinados à alimentação de animais, por conter porção de amido digestível, além da fibra alimentar que é associada à saúde do intestino (SOUZA, 2018). Cerca de 10% das empresas destinam o bagaço para a produção de ração, no entanto, cerca de 47% do bagaço é distribuído gratuitamente aos interessados (EMBRAPA, 2003).

3.1.1 Composição do amido da mandioca

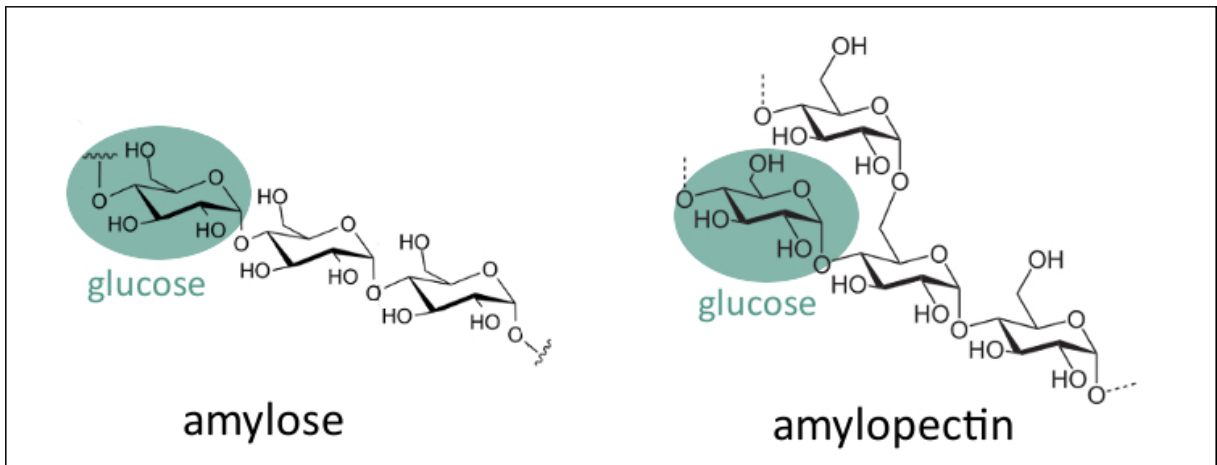
O amido é um polímero composto por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas, que formam outros polímeros, predominantemente a amilose e a amilopectina. A amilose é formada por moléculas de glicose unidas por ligações $\alpha(1-4)$, possuindo configuração retilínea, e a amilopectina, onde as unidade de glicose são unidas por ligações $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$, que conferem à molécula configuração ramificada. A fécula de mandioca apresenta 18% de amilose e 82% de amilopectina na composição de seu amido.

Figura 1 – Amilose e amilopectina, componentes do amido da mandioca.



Fonte: Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008).

Figura 2 – Estrutura da amilose e amilopectina.



Fonte: Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008).

3.1.2 Hidrólise do amido de bagaço de mandioca

Segundo Carta (1999), antes de realizar a hidrólise enzimática do bagaço de mandioca, é necessário gelificar o amido a 100°C por 10 minutos. Woiciechowski (2002), utilizando bagaço contendo 66% do peso seco de amido residual, registrou

recuperação de 94,5% de açúcar redutor a partir do amido utilizando hidrólise ácida com ácido clorídrico, e 97,3% de recuperação de açúcar quando feita a hidrólise enzimática com α -amilase e amiloglucosidase. Segundo Valeriano (2018), dentre quatro fatores analisados (concentração de amiloglucosidase, concentração de α -amilase, tempo de liquefação e tempo de sacarificação), o mais significativo no processo de hidrólise foi a concentração de amiloglucosidase, e reportou os melhores resultados utilizando os períodos de 1 hora para a liquefação com α -amilase a 100°C, e 2 horas para a sacarificação com amiloglucosidase a 60°C.

3.2 Cevada

A cevada (*Hordeum* sp.) pertence à família das gramíneas e seus grãos são destinados à alimentação humana, ou à produção de ração para animais. No Brasil, 75% da produção é destinada à indústria, 19% para produção de ração animal e 6% para semente. (AGEITEC, 2017)

Na alimentação humana, a cevada é uma das fontes principais do malte utilizado na produção de bebidas alcoólicas, e a partir do malte, é possível extrair uma grande variedade de enzimas, como proteases, lipases, oxirredutases, hemicelulases, e principalmente as amilases. O grão do cereal é formado por um embrião, um endosperma, uma camada de aleurona (responsável pelo fornecimento de enzimas hidrolíticas), e o epicarpo que recobre o grão, sendo que 90% do endosperma é constituído de amido (LIMA *et al.*, 2001). A composição geral do grão de cevada consiste em cerca de 65% a 68% de amido, 10% a 17% de proteína, 4% a 9% de β -glucanos, 2% a 3% de lipídios livres, e 1,5% a 2,5% de minerais (Czuchajowska *et al.*, 1998).

A produção industrial do malte a partir dos grãos de cevada consiste em iniciar o processo de germinação, que faz com que o embrião libere ácido giberélico, responsável pela liberação de enzimas que ocorre em sequência. As enzimas mais importantes produzidas nesse processo são as α -amilases e as β -amilases, sendo que a faixa de pH ótima para a atividade destas enzimas é entre 5,2 e 5,6 (MacWilliam, 1975). A α -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ internamente, e sua ação na hidrólise do amido pode ser dividida em duas fases, uma rápida dextrinização, seguida da sacarificação, que resulta principalmente em maltose e glicose, a β -amilase hidrolisa as moléculas de amido a partir do final não

reduzidor, liberando maltose (Evans, 2009). A α -dextrinase, também presente no malte de cevada, hidrolisa o amido pelas ligações $\alpha(1-6)$ da amilopectina (BERG, 2008).

O tempo de germinação depende da qualidade de malte que se deseja obter, e após esse período, é feita a secagem dos grãos, que paralisa a atividade biológica e reduz a umidade a níveis adequados ao armazenamento. Mediante alterações em umidade, tempo e temperatura durante a secagem, é que se determina a cor e o aroma final do malte (LIMA *et al.*, 2001). Os grãos de cevada destinados à indústria cervejeira, devem apresentar características como germinação mínima de 95%, percentagem de grãos classe 1 acima de 85% e teor de proteína não excedendo 12% (DSMM/CATI, 2004).

3.3 Leveduras e o processo fermentativo

As leveduras são fungos, portanto são eucarióticos, heterotróficos, não sintetizam clorofila, armazenam glicogênio como material de reserva, e possuem parede celular rígida. As leveduras são os principais organismos utilizados na fermentação alcoólica, em especial a levedura *Saccharomyces*, que são organismos aeróbios facultativos, sendo os produtos finais da metabolização de açúcar determinados pelas condições ambientais em que estas se encontram. Em aerobiose, o açúcar é transformado em biomassa, CO_2 e H_2O , enquanto que em condições anaeróbias, o açúcar entra em uma via metabólica que tem o principal objetivo de gerar ATP, mas também produz CO_2 e etanol como produtos de excreção em grande quantidade, processo chamado de fermentação alcoólica (BORZANI, 2001).

A fermentação alcoólica envolve 12 reações sequenciais, cada uma realizada por uma enzima específica. Esse processo acontece no citoplasma celular, sendo que as enzimas sofrem ações de fatores como pH, temperatura, oxigenação, inibidores presentes, entre outros. O tipo de levedura utilizado também tem grande influência sobre o desempenho do processo fermentativo (BORZANI, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Leveduras

Empregou-se 2 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, uma utilizada na fabricação de cerveja, e a outra utilizada na fabricação de etanol industrial. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer (SUSSMAN, 1974)

4.1.1 *Levedura de cervejaria*

A levedura de cervejaria foi obtida no comércio, e no momento de sua utilização foi inoculada em solução salina em uma concentração de $4,5 \times 10^8$ células por mL.

4.1.2 *Levedura da indústria alcooleira*

Partindo de uma cultura estoque mantida no laboratório sob imersão em óleo mineral e refrigeração, porções de células foram inoculadas em meio YEPD líquido (1% extrato de levedura, 2% peptona, e 2% glicose em água destilada). Após 48h de cultivo, os frascos foram deixados em refrigeração para decantar. A seguir as células foram coletadas em solução salina em uma concentração de $2,02 \times 10^9$ células por mL.

4.2 **Malte de Cevada**

O malte de cevada utilizado foi do tipo pilsen ou pale ale (de acordo com a disponibilidade). Esses maltes são considerados maltes base do processo cervejeiro devido a quantidade de enzimas presentes. O material foi obtido por doação de uma empresa de fabricação artesanal de cerveja.

4.3 **Bagaço de mandioca**

O bagaço de mandioca utilizado foi obtido por doação de uma indústria de processamento denominada em geral por fecularia. O bagaço úmido recebido foi transportado ao laboratório e a seguir submetido a secagem por exposição ao sol em bandejas e frequentemente revolvido. Após a secagem o bagaço foi acondicionado em embalagem de PVC e mantido sob refrigeração em câmara fria até o momento de seu uso. O bagaço após a secagem teve aspecto rígido e granular.

4.4 Equipamentos e vidraria

Foram utilizados equipamentos e vidraria usual de laboratório de microbiologia.

4.5 Análises

4.5.1 Determinação de concentração do bagaço hidratado

Com o intuito de determinar qual concentração de bagaço de mandioca permite as melhores condições para que ocorra a hidrólise enzimática, por se tratar de um material rico em amido, que tem sua viscosidade aumentada quando aquecido, por conta do processo de gelatinização, foram utilizados 4 tratamentos com diferentes concentrações de bagaço, onde o material desidratado foi adicionado à água destilada nas proporções descritas na tabela 1. Após 120 minutos da adição de água ao bagaço, o material foi homogeneizado em liquidificador. As misturas foram aquecidas até a ebulição durante 10 minutos e distribuídas em erlenmeyers. O malte de cevada foi adicionado aos frascos, e estes foram então colocados em shaker durante 120 minutos a 66°C a 110 rpm.

Tabela 1 – Proporções de bagaço de mandioca testadas no processo de hidratação

Tratamentos	Bagaço(g)	Água Destilada (mL)	Malte(g)
1	10	90	0,5
2	20	80	0,5
3	30	70	0,5
4	40	60	0,5

4.5.2 Hidrólise do bagaço de mandioca

O bagaço de mandioca desidratado foi retirado da câmara fria, a seguir foi triturado em almofariz até a obtenção de um pulverizado fino. Este material foi colocado em porções de 2,5g em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de água destilada. As amostras foram aquecidas em bico de Bunsen sobre tela de amianto com o objetivo de verificar a liberação do amido dos grânulos. Após resfriamento adicionou-se 0,4 g de malte de cevada e o material foi mantido em shaker a 66°C durante 120 minutos a 110 rpm.

As mesmas condições de hidrólise do amido também foram aplicadas ao bagaço não submetido ao aquecimento. Os resultados foram acompanhados por análise microscópica.

4.5.3 Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida

O bagaço retirado da câmara fria foi triturado em um almofariz. A seguir foi hidratado e o pH ajustado a 1,6 com HCl e fervido em bico de Bunsen durante 20 minutos. Após o aquecimento mediu-se os graus Brix e o pH foi elevado a 5,4 com NaOH. A seguir 0,5 g de cevada pré germinada foi adicionada aos frascos que foram aquecidos e agitados a 66°C durante 80 minutos. Após o resfriamento adicionou-se *S. cerevisiae* e acompanhou-se a fermentação por 5 dias.

4.5.4 Avaliação de liberação de açúcar em diferentes concentrações de malte

Para realizar o experimento 1, o bagaço seco foi retirado da câmara fria e triturado em liquidificador. A seguir o bagaço foi colocado em erlenmeyers juntamente com água destilada. Foram tamponados e autoclavados durante 10 minutos a 1 atmosfera de pressão a 121°C.

Após o resfriamento da autoclave o material apresentava-se com muita viscosidade e com aspecto granular. Este material foi filtrado em uma camada de algodão. Aos líquidos filtrados adicionou-se malte de cevada para então ser feita a hidrólise do material, que foi realizada ao longo de 100 minutos a 66°C sob agitação. Posteriormente foi adicionada a levedura cervejeira numa concentração de 9×10^8 células por frasco. As amostras foram incubadas a 28 °C durante 72 horas. A seguir procedeu-se à leitura da quantidade de etanol produzido por meio de um ebulliômetro, medida em graus alcoólicos.

Foram realizados 6 tratamentos diferentes em triplicata, em 3 deles a fermentação foi feita apenas com o malte como controle, e nos outros 3 tratamentos foi utilizado o bagaço de mandioca além do malte.

Tabela 2 – Amostras com diferentes concentrações de bagaço e malte

Tratamento	Água Destilada (mL)	Malte (g)	Bagaço (g)
1	150	5	-
2	150	10	-
3	150	15	-
4	150	5	15
5	150	10	15
6	150	15	15

4.5.5 Melhoria nutricional do bagaço de mandioca

O bagaço foi retirado da câmara fria e após a trituração em almofariz foi hidratado e autoclavado durante 5 minutos a 1 atm e 121°C. A seguir o bagaço foi

separado em dois frascos, enriquecido com solução nutritiva composta por 3g de extrato de levedura, 3g de peptona, e 2g de K_2HPO_4 , inoculado com levedura e deixado em estufa a 30°C por 48 horas. Após esse período, foi verificada a presença de contaminante bacteriano que inviabilizou os resultados.

4.5.6 Determinação de açúcares redutores totais

Retirou-se da câmara fria 25g de bagaço de mandioca desidratado. A seguir acrescentou-se 500 mL de água para hidratar o bagaço por 12 h sob refrigeração. A seguir homogeneizou-se em liquidificador e o pH foi ajustado para 5,4. Este material foi distribuído em 5 erlenmeyers com 100mL cada e posteriormente autoclavado a 1 atm de pressão e 120°C. Após resfriamento adicionou-se 2,5g de malte e os frascos foram incubados a 60°C por 120 minutos a 110 rpm. A este material adicionou-se 1mL da levedura de produção de etanol obtida de acordo com o item 4.1.1.2. Os frascos foram incubados a 28°C e a fermentação foi acompanhada pelo decaimento dos graus brix durante 40h. A seguir, avaliou-se a produção de etanol por ebuliometro.

Os açúcares totais de 4 tratamentos (bagaço, malte hidrolisado, bagaço com malte hidrolisados, e bagaço com malte hidrolisados após fermentação) foram medidos de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico (Maldonado et al., 2013). Inicialmente, as amostras foram diluídas de forma a terem uma concentração de açúcares redutores de no máximo 2 g/L (com base em leituras realizadas no aerômetro de Brix) para que o teste de ADNS fosse realizado. Foi feita a curva-padrão utilizando solução de glicose em diferentes concentrações para que a concentração de ART (açúcares redutores totais) fosse calculada. O rendimento fermentativo foi calculado segundo Stupiello *et al* (1983).

4.5.7 Verificação da produção de etanol e avaliação do nitrogênio total

Acrescentou-se 1000 mL de água destilada a 50 g de bagaço de mandioca desidratado para hidratação. Ajustou-se o pH para 5,4. O material após homogeneização foi distribuído em 16 frascos organizados em 3 grupos como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação de graus brix, produção de etanol e nitrogênio total.

Tratamentos	Bagaço(g)	Malte(g)	Nutrientes(mL)	Extrato de levedura
1	2,5	1,5	0,025	0,05
2	2,5	1,5	-	-
3	2,5	1,5	-	0,05

Nutrientes: K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$.

Todos os frascos foram autoclavados e então inoculados com levedura de produção de cerveja e incubados a 30°C durante 11 horas. A seguir protocolou-se a avaliação

da produção de etanol pelo método ebulliométrico. Parte das amostras de cada duplicata foram levadas à estufa e submetidas à secagem. Após a secagem avaliou-se o teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, segundo roteiro cedido pelo Prof. Dr. Carlos Corso.

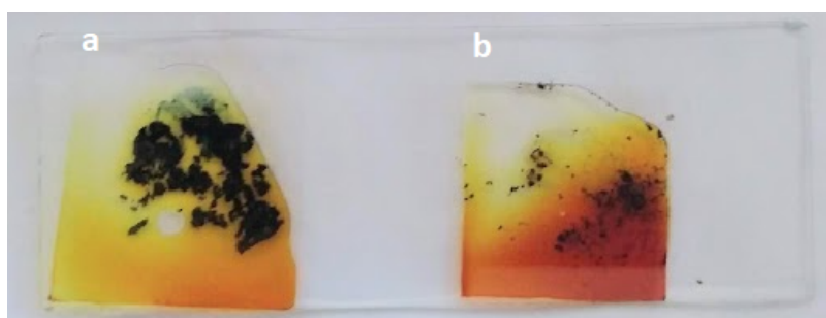
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos realizados com o bagaço de mandioca envolvendo hidratação, hidrólise e fermentação permitiram verificar os seguintes resultados:

Durante a execução da análise 4.5.1, notou-se que mesmo que o material seja colocado em hidratação e autoclavado a 121°C, ainda é necessário uma trituração até a formação de um material homogêneo, pois o bagaço não sofre desagregação dos grânulos, o que reduz a capacidade das enzimas hidrolíticas de acessarem o amido disponível no material, reduzindo assim, a liberação de açúcares fermentescíveis.

Com o experimento 4.5.2, observou-se ao microscópio que o bagaço hidratado, quando corado com lugol, mostrava-se ainda compactado e o amido na forma granular, e quando o material é aquecido até o ponto de ebulição por 5 minutos, observa-se a dispersão do amido, como pode se verificar nas áreas de sombreamento azuladas na figura 3.

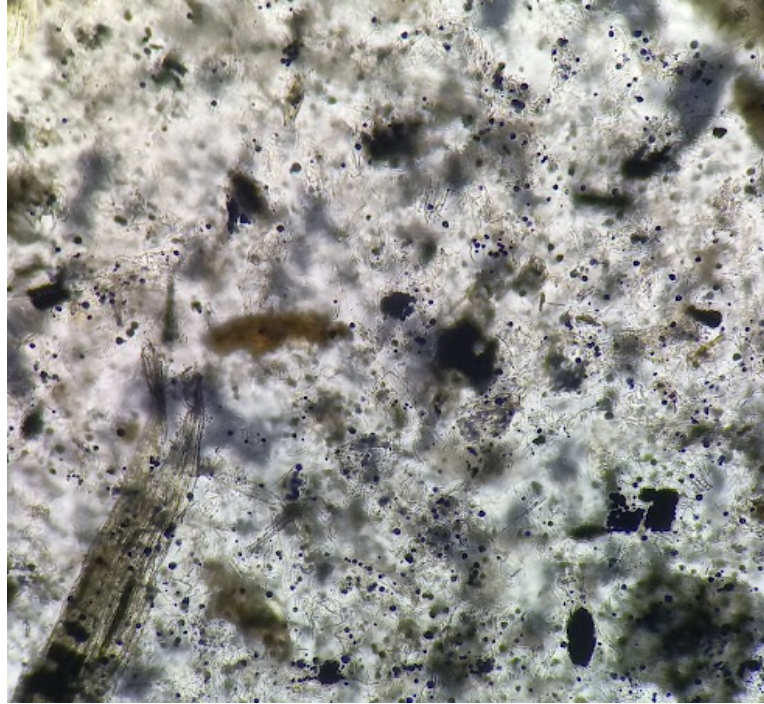
Figura 3 – Bagaço corado com lugol, em lâmina.



a: Bagaço fervido; b: Bagaço não fervido.

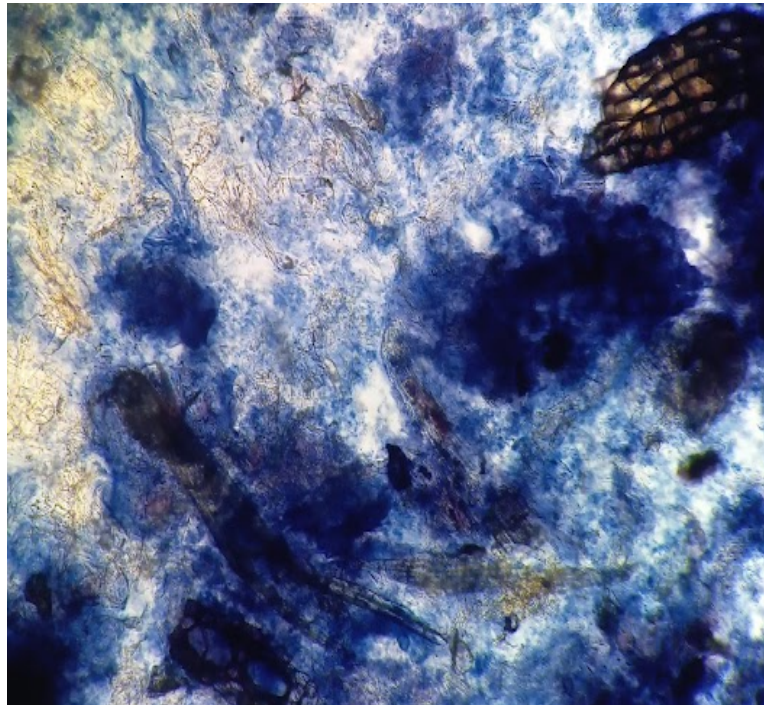
Com o acompanhamento das etapas de preparo e hidrólise do material, foi possível observar o efeito do aquecimento e a atuação das enzimas no amido presente no bagaço de mandioca.

Figura 4 – Bagaço sem tratamento, corado com lugol, x12,5.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5 – Bagaço autoclavado, corado com lugol, x12,5.

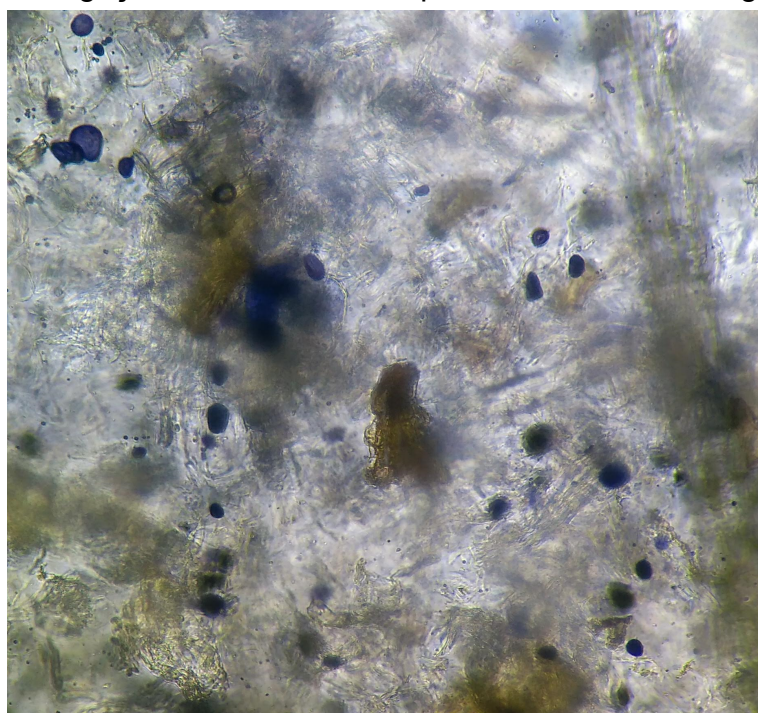


Fonte: Elaborado pelo autor

Este experimento mostra a necessidade da hidratação e do aquecimento do bagaço. Sem a quebra do grânulo de amido (Figura 4) e a liberação das moléculas,

as enzimas hidrolíticas não conseguem atingir as ligações glicosídicas para liberação do polímero de glicose. Após a fervura do material, é possível observar sob microscópio, que o amido gelatinizado fica livre, facilitando o acesso das enzimas ao substrato (Figura 5). Quando o bagaço não é aquecido antes de se iniciar o processo de hidrólise, observa-se que nem todo amido é transformado em açúcar, pois os grânulos de maior tamanho ainda são visíveis, como mostra a figura 6.

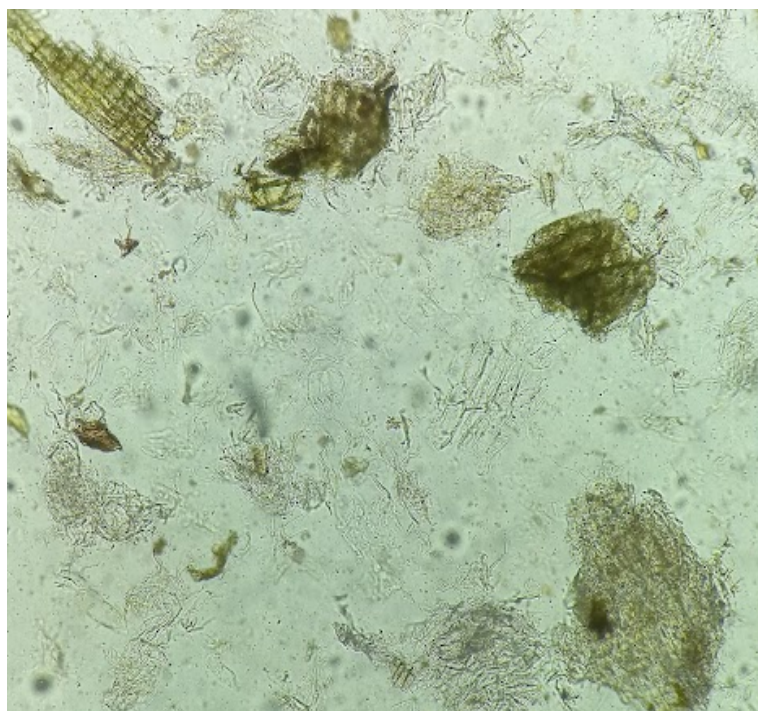
Figura 6 – Bagaço hidrolisado, não aquecido, corado com lugol, x12,5.



Fonte: Elaborado pelo autor

Estes resultados indicam que a presença do malte com as enzimas α -amilase, β -amilase e dextrinase é capaz de viabilizar a hidrólise completa do amido disponível no bagaço (Figura 7), quando este é previamente aquecido.

Figura 7 – Bagaço autoclavado, hidrolisado, corado com lugol, x12,5.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os testes comparativos entre as hidrólises ácida e enzimática, permitiram verificar que a hidrólise ácida de 20 minutos sob aquecimento elevou os graus brix da amostra a 1,2° Bx. Entretanto, a hidrólise enzimática favoreceu o aumento do brix a 2,5° Bx, indicando que sob essas condições, a hidrólise ácida foi menos efetiva em liberar sólidos solúveis na forma de açúcares, que a hidrólise enzimática. Posteriormente, verificou-se que a fermentação alcoólica foi deficitária, pois mesmo após 48 horas o teor alcoólico atingiu apenas 0,3%.

O bagaço hidratado apresenta uma viscosidade que dificulta o processo de hidrólise e também de fermentação, portanto, para que estes processos fossem viáveis, as amostras tiveram que ser preparadas com uma concentração de no máximo 10% do bagaço desidratado diluído em água, como mostram as figuras 8 e 9.

Figura 8 – Bagaço de mandioca hidratado, não filtrado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9 – Bagaço de mandioca hidratado, filtrado.



Fonte: Elaborado pelo autor

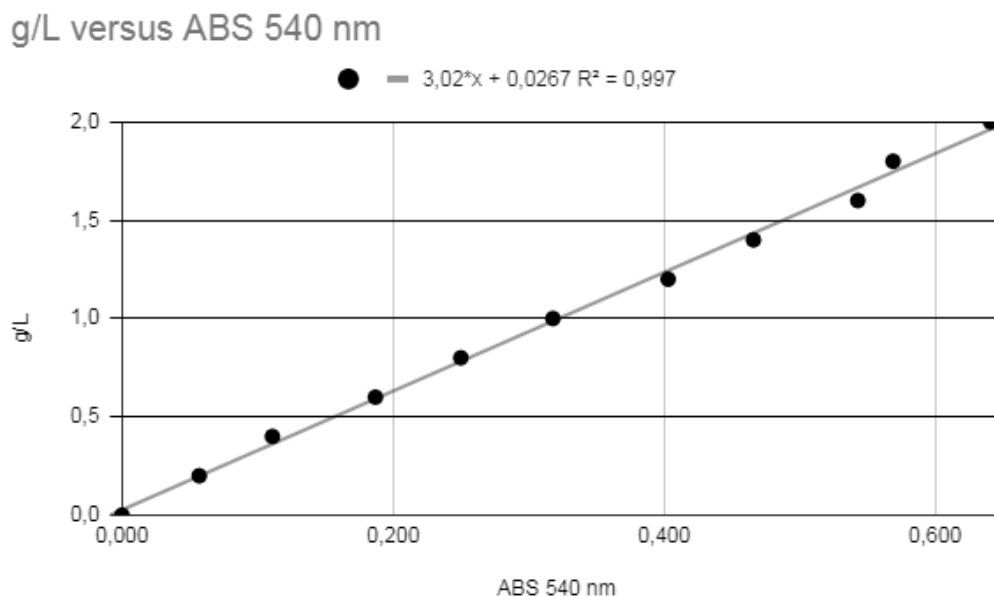
Tabela 4 – Valores de sólidos solúveis obtidos do bagaço após autoclavagem e hidrólise, e de graduação alcoólica após fermentação.

Tratamentos	Bagaço (g)	Malte(g)	Graus Brix	Grad. alc.
1	-	5	2,00	1,0
2	-	10	4,43	2,4
3	-	15	6,93	3,0
4	15	5	6,07	1,4
5	15	10	8,00	2,4
6	15	15	10,23	3,4

O aumento observado nos valores de sólidos solúveis, medidos através dos graus Brix, não acompanha uma proporcionalidade considerando-se o aumento na concentração de bagaço e malte.

O bagaço de mandioca após o processamento para extração do amido, ainda retém quantidade considerável deste material. Segundo Czuchajowska *et al.* (1998), a cevada contém entre 65% e 68% de amido, e o bagaço de mandioca contém 40% a 63% de amido residual, segundo Woiciechowski *et al.* (2002). De acordo com estes dados, os valores máximos teóricos de graus Brix esperados sob condições de hidrólise enzimática, seriam entre 9,25°Bx e 12,85°Bx para uma solução contendo 15g de bagaço e 5g de malte de cevada. Considerando os resultados anteriores a respeito da hidrólise, que indicam hidrólise total do amido presente no material, os valores de sólidos solúveis observados indicam que o material utilizado possui baixa quantidade de amido residual.

Figura 10 – Curva-padrão de açúcar redutor.



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 5 – Concentração de açúcares redutores totais

Amostra	ART (g/L)
1	2,30
2	12,38
3	52,06
4	12,26

Amostras: 1-bagaço não hidrolisado; 2-malte hidrolisado; 3-bagaço e malte hidrolisados; 4-bagaço com malte hidrolisados após fermentação.

Considerando-se os valores de ART obtidos (tabela 5), é possível observar a liberação de 37,38 g/L de ART pelo bagaço durante sua hidrólise, já que dos 52,06 g/L do mosto hidrolisado, 12,38 g/L são provenientes do malte, e 2,30 g/L já estavam no bagaço pré-hidrólise. Os 12,26 g/L de ART não consumidos durante a fermentação indicam que nem todo açúcar presente no mosto é fermentescível, apenas 39,8 g/L foram consumidos.

O rendimento teórico para 39,8 g de glicose é de 20,27 g de etanol, ou 25,66 mL/L.

O valor de etanol, medido em ebuliômetro, obtido através da fermentação foi de 12 mL/L, isso aponta um rendimento prático de 46,77%. Esses valores indicam que a

fermentação não foi realizada em condições ótimas. A levedura de cervejaria e a levedura da indústria alcooleira apresentaram teores alcoólicos similares.

Para a verificação do nitrogênio total, o bagaço de mandioca foi distribuído conforme o protocolo da tabela 6, sendo que após 11 horas da inoculação com levedura de cervejaria, forneceu os seguintes resultados.

Tabela 6 – Brix e graduação alcoólica após fermentação

Tratamento	°Brix	Etanol (%)
1	2,20	0,90
2	1,85	0,94
3	1,86	0,83

Tratamentos: 1(Com K_2HPO_4 e $(NH_4)_2SO_4$); 2 (Sem nenhum aditivo); 3 (Com extrato de levedura).

Tabela 7 – Proteína total nas amostras

Tratamento	Nitrogênio total (%)	Proteína (%)
Apenas bagaço	1,04	6,50
Apenas malte	1,58	9,88
Bagaço+Malte+Nutrientes*	1,42	8,88
Bagaço+Malte	1,05	6,56

Nutrientes: K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$ e extrato de levedura

De acordo com os dados obtidos, a síntese de proteína durante a fermentação foi menor quando havia a presença de bagaço de mandioca. Mesmo com a adição dos nutrientes, que aumentou a síntese proteica na amostra em 37%, o tratamento com o bagaço ainda apresentou menores quantidades de proteína total em comparação com a fermentação apenas do malte. O processo de fermentação aplicado neste trabalho não agregou valor nutricional relevante ao resíduo analisado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios realizados visando o aproveitamento do bagaço de mandioca produzido após extração do amido permitiram, ainda que preliminarmente, verificar que o material possui amido aproveitável. Este amido residual pode ser convertido em açúcares fermentáveis mediante prévia homogeneização e aquecimento. Nestas condições, o malte de cevada, que contém as enzimas α -amilase, β -amilase e dextrinase, é capaz de viabilizar a hidrólise completa do amido disponível no bagaço. Este material submetido a fermentação por leveduras gerou etanol. A levedura de cervejaria e a levedura da indústria alcooleira não indicam diferenças nos teores alcoólicos obtidos. A fermentação quando enriquecida com peptona e extrato de levedura mostrou um pequeno aumento no teor alcoólico. Em uma análise preliminar, pode-se inferir que no bagaço de mandioca possa existir algum produto que interfere na fermentação, pois o malte puro apresentou resultados mais satisfatórios. A análise de açúcares redutores mostra valores que são referenciados como glicose, no entanto os teores alcoólicos e os açúcares redutores totais residuais mostram que existem substâncias redutoras que não foram fermentadas.

7 REFERÊNCIAS

- AGEITEC. **Cevada**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cevada> Acesso em : 14 set. 2022.
- ARIENTE, M.; Giuliani, A. C.; Farah, O. E.; Pizzinatto, N. K.; Spers, E. E. Competitividade na indústria de fécula de mandioca: estudo exploratório. **Revista FAE**, v. 8, n. 2, p. 53-60, 2005.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6th. ed. Guanabara Koogan, 2008.
- BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia industrial: vol. 1 fundamentos**. 1 ed. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 254 p., 2001.
- CARTA, F. S., Hidrólise Enzimática de Bagaço de Mandioca e Produção de ácido fumárico por fermentação do fungo *Rhizopus*. Dissertação de Mestrado. **Departamento de Engenharia Química**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1999.
- CEREDA, M.P. *et al.* Evaluation of fermented cassava starch quality: Absorption, expansion and basic formulation for biscuit confection for sensory analysis. **Anais do Congresso Brasileiro da Mandioca**, Salvador. p.31, 1994.
- CUZIN, N.; LABAT, M. Reduction of cyanide levels during anaerobic digestion of cassava. **Int. J. Food Sci. Technol.** v.27, p.329, 1992.
- CZUCHAJOWSKA, Z. *et al.* Structure and functionality of barley starches. **Cereal Chem.**, v.75, n.5, p.747-754, 1998.
- DSMM/CATI. **Cevada Cervejeira em São Paulo**. Disponível em: http://www.cati.sp.gov.br/Cati/_tecnologias/cereais/CEVADA_CERVEJEIRA.pdf Acesso em : 14 set. 2022.
- DUARTE, A. S. *et al.* Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição a adubação mineral. **R. Bras. Eng. Agri. e Amb.**, vol.16, n.3, p.262-267, 2012.
- EL-SHARKAWY, M. A. Physiological characteristics of cassava tolerance to prolonged drought in the tropics: Implications for breeding cultivars adapted to seasonally dry and semiarid environments. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 257–286, 2007.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A indústria do amido de mandioca**. Secretaria de gestão e estratégia. Documentos 6. Brasília. 201 p., 2003.
- Evans, D.E., Li, C., Eglinton, J.K. The Properties and Genetics of Barley Malt Starch Degrading Enzymes. **Genetics and Improvement of Barley Malt Quality**. 1 ed. Berlin, p. 143-189, 2009.

FAO. **The state of food and agriculture 2016**: Climate change, agriculture and food security. Rome, 2016.

FIORDA, F. A. *et al.* Farinha de bagaço de mandioca: Aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v.43, p. 408–416, 2013.

GLANPRACHA, N.; ANNACHHATRE, A.P. Anaerobic co-digestion of cyanide containing cassava pulp with pig manure. **Bioresour. Technol.** v. 214, p. 112–121, 2016.

GUPTA, N.; BALOMAJUMDER, C.; AGARWAL, V.K. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: a review. **J. Hazard. Mater.** v.176, p.1–13, 2010.

LACERDA, L. G. *et al.* Thermoanalytical and starch content evaluation of cassava bagasse as agro-industrial residue **Braz. arch. biol. technol.**, v.52, p. 143-150, 2009.

LIMA, U. A. *et al.* **Biotecnologia industrial: vol. 3 processos fermentativos e enzimáticos**. 1 ed. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 593 p., 2001.

MACWILLIAM, I. C. pH IN MALTING AND BREWING-A REVIEW. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 81, p. 65–70, 1975.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Brasília. Embrapa, 2013.

MORALES, E. M. **Bioconversão mediante fermentação em estado sólido de bagaço e folhas de mandioca por fungos visando melhoria da qualidade nutricional**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Bociências de Rio Claro, 2016.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th Edition, 1-1294. 2008.

PANDEY, A. *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. II. Cassava bagasse. **Bioresource Technology**. 74, 81-87, 2000.

PARMAR, A.; STURM, B.; HENSEL, O. Crops that feed the world: Production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses. **Food Security**, v.9, n.5, p. 907–927, 2017.

RATTANACHOMSRI, U. *et al.* Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **J. Biosci. Bioeng.** v. 107, p. 488–493, 2009.

STUPIELLO, J. P. *et al.* **Fermentação**. Cooperativa central dos produtores de açúcar e álcool do estado de São Paulo. 1983.

SUSSMAN, A. S. **Microorganismos: crescimento, nutrição e interação**. 1 ed. São Paulo, p. 56-60, 1974.

WOJCIECHOWSKI, A. L. *et al* . Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 45, n. 3, p. 393-400, 2002.

VALERIANO, I. H. *et al*. Cassava Pulp Enzymatic Hydrolysate as a Promising Feedstock for Ethanol Production. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 61(0). 2018.

SOUZA, C. B. *et al*. Characterization and in vitro digestibility of by-products from Brazilian food industry: cassava bagasse, orange bagasse and passion fruit peel. **Bioactive Carbohydrates And Dietary Fibre**, v. 16, p. 90-99, 2018.