UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LANNA LÔBO DE ARAÚJO

PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE AMIDO UTILIZANDO-SE AMILASES RECOMBINANTES

Manaus

2012

LANNA LÔBO DE ARAÚJO

PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE AMIDO UTILIZANDO-SE AMILASES RECOMBINANTES

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho
Co-orientadora: Drª. Leonor Alves de Oliveira da Silva

Manaus
2012

LANNA LÔBO DE ARAÚJO

PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE AMIDO UTILIZANDO-SE AMILASES RECOMBINANTES

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho –UFAM

_____

Dr. Roberto Nobuyuki Maeda-UFRJ

_____

Profa. Dra. Sônia Maria de Carvalho-UFAM

.

Aos meus pais, Dalvino e Valcy, pela educação que recebi, pela dedicação, carinho e amor;

Aos meus irmãos Indramara, Márcio e Dalvino Jr

A minha Cunhada Nilda

Aos meus Sobrinhos Matheus, Indra, Maria Luiza, Marina e João

Pelo carinho e apoio incondicional em TODAS as minhas conquistas.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho contei com a ajuda de pessoas especiais, às quais sou profundamente grata.

Aos meus orientadores Dr. Spartaco Astolfi Filho e Drª. Leonor Alves de Oliveira da Silva, pelo voto de confiança, incentivo e oportunidade de trabalhar na área de bioprocessos e biotecnologia industrial, agradeço também pela atenção, as discussões e contribuições científicas e o auxílio na correção dos trabalhos e de mais esta realização.

Aos membros da Banca Examinadora pela atenção, correção e contribuição na finalização deste trabalho.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM/UFAM por disponibilizar recursos e instalações para realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos - LADEBIO na pessoa do Professor Dr. Nei Pereira Jr. pelo auxilio com a permissão de uso de equipamentos laboratoriais da UFRJ, que foi de grande importância para o termino desta dissertação.

Aos colegas de trabalho e alunos do ICET/UFAM de Itacoatiara, meus diretores Dr. Cícero Mota e Dr. Fábio Medeiros, minhas coordenadoras acadêmicas Dra. Margarida Carmo de Souza e Dra. Odinéia Pamplona; e minha coordenadora de curso Dra. Camila Martins, pela solicitude, apoio e compreensão na fase de conclusão deste trabalho.

Ao Maeda pelas informações e sugestões que muito contribuíram para realização de todas as etapas deste trabalho.

A Dina Assunção e Franz Berbert, por me apoiarem sempre em todos os ajustes técnicos – gambiarras – quando precisava utilizar um método alternativo nos experimentos!!!

Aos amigos de labuta madrugadas a dentro, pela especial ajuda na parte experimental, pelo bom humor incontestável e por tornar o laboratório um ambiente alegre e descontraído. Obrigada pela amizade e companheirismo.

Aos meus colegas de curso, que sempre apresentaram grande paciência quando a parte biológica e bioquímica teimava em não se fazer clara para mim, pela troca de experiências, apoio e companheirismo durante esta trajetória.

Aos meus pais, pelo apoio em todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos Indramara, Márcio e Dalvino Jr; cunhada Nilda; sobrinhos Matheus, Indra, Maria Luiza, Marina e João pelo apoio e carinho, principalmente durante a realização dos experimentos.

A todos os amigos e aos que contribuíram, de alguma maneira, para a realização deste trabalho.

A PETROBRAS pelo financiamento e a FAPEAM pela bolsa de estudos.

E a Deus por me guiar em mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	11
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	13
2.1	O amido	13
2.1.1	Amilose	14
2.1.2	Amilopectina	15
2.2	Fécula de mandioca	16
2.2.1	Composição química do amido de mandioca	19
2.2.2	A produção de bioetanol a partir da mandioca	20
2.3	Produção de etanol no Brasil	21
2.3.1	História do álcool	21
2.3.2	Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL)	21
2.4	Enzimas amilolíticas ou modificadoras de amido	22
2.4.1	As α-amilases	23
2.4.2	Glicoamilases	25
2.4.3	A α-amilase recombinante	28
2.4.4	Glicoamilase recombinante	29
2.5	Hidrólise enzimática do amido	29
2.6	Fermentação alcoólica	31
3	**OBJETIVOS**	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	35
4.1	Concentração das amilases recombinantes	35
4.2	Dosagens amilolíticas	36
4.2.1	Atividade dextrinizante da α-amilase	36
4.2.2	Atividade amiloglicosidásica	36
4.2.3	Quantificação de glicose pelo método glicose oxidase	37
4.3	Quantificação do teor de amido na fécula de mandioca	38
4.4	Estudo da hidrólise enzimática da fécula de mandioca	39
4.4.1	Hidrólise de fécula de mandioca	41
4.5	Fermentação do hidrolisado de fécula de mandioca pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentômetros	42
4.6	Determinação do Teor de Etanol	45
4.6.1	Destilação das amostras	45
4.6.2	Análise do álcool	45

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 46
5.1 Concentração dos extratos enzimáticos das amilases recombinantes 46
5.1.1 Concentração das amilases recombinantes 46
5.2 Quantificação do teor de amido na fécula de mandioca 48
5.3 Estudo da hidrólise enzimática da fécula de mandioca 48
5.4 Hidrólise de fécula de mandioca 52
5.5 Fermentação do hidrolisado de fécula de mandioca pela levedura Saccharomyces cerevisiae em fermentômetros 53
5.6 Análise do álcool 54
6 CONCLUSÕES 59
7 PERSPECTIVAS 60
REFERÊNCIAS 61

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura Química do Amido.....	13
2	Estrutura química e helicoidal da molécula de amilose.....	14
3	Estrutura química da amilopectina.....	16
4	Evolução da Produção de fécula.....	18
5	Mecanismo de ação da α-amilase sobre os componentes do amido (A) Amilose; (B) Amilopectina.....	24
6	Mecanismo de ação da glucoamilase sobre os componentes do amido. (A) Amilose; (B) Amilopectina.....	27
7	Fluxograma representativo do processo de estudo da hidrólise enzimática da fécula de mandioca.....	40
8	Fermentômetro – fermentação da fécula de mandioca.....	44
9	Diagrama de Pareto para hidrólise com amilases comercial.....	50
10	Diagrama de Pareto para hidólise com amilases recombinantes.....	50
11	**A)** Superfície de resposta do estudo da carga enzimática com amilases comerciais **B)** Superfície de resposta do estudo da carga enzimática com amilases recombinantes.....	51
12	Perfil cinético da eficiência de hidrólise da fécula de mandioca utilizando amilases comerciais.....	52
13	Perfil cinético da eficiência de hidrólise da fécula de mandioca utilizando amilases recombinantes.....	52
14	Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado das amilases recombinantes de fécula de mandioca, em fermentômetro, utilizando levedura comercial nas concentrações de 4, 10 e 20 g/L.....	54
15	Perfil cromatográfico HPLC do etanol – padrão.e 10 g/L de etanol.....	55
16	Perfil cromatográfico da amostra 1. Tendo a área média de 1306184 e quantidade de 14,81010 g/L de etanol.....	55
17	Perfil cromatográfico da amostra 2. Tendo a área média de 1235976 e quantidade de 14,04 g/L de etanol.....	56
18	Perfil cromatográfico da amostra 3. Tendo a área média de 1422195 e quantidade de 16,12557 g/L de etanol.....	56
19	Perfil cromatográfico da amostra 4. Tendo a área média de 1599423 e quantidade de 18,13508 g/L de etanol.....	57
20	Perfil cromatográfico da amostra 5. Tendo a área média de 1883766 e quantidade de 21,3591 g/L de etanol.....	57
21	Perfil cromatográfico da amostra 5. Tendo a área média de 1767400 e quantidade de 20,03969 g/L de etanol.....	58
22	Perfil cromatográfico da amostra 6. Tendo a área média de 1904128 e quantidade de 21,58998 g/L de etanol.....	58

LISTA DE TABELAS

1 Teores de amilose e amilopectina em diversas fontes amiláceas..... p. 15

2 Composição química da raiz de mandioca..... p. 20

3 Enzimas envolvidas na hidrólise do amido..... p. 31

4 Matriz do Planejamento(fatorial 2^3) para as cargas enzimáticas na hidrólise do amido de fécula de mandioca para condição ideal de hidrólise geradas pelo DCCR..... p. 39

5 Matriz do planejamento experimental e resultados da hidrólise enzimática do amido..... p. 49

RESUMO

Há algumas décadas a busca por fontes energéticas alternativas está em foco no circuito mundial. Por questões ambientais, econômicas e geopolíticas essa procura tem se acirrado, e uma das fontes alternativas de energia, que desperta essa tendência em substituir os combustíveis fósseis é o etanol; que é um combustível menos poluente. E cada vez mais empresas, governos e pesquisadores têm voltado seu foco de pesquisa para ele. O álcool obtido por fermentação de biomassas é denominado "bioetanol". A posição do Brasil em relação ao aproveitamento integral das biomassas é bastante privilegiada pelo fato do mesmo possuir a maior biodiversidade do planeta; uma intensa radiação solar; água em abundância; diversidade de clima e pioneirismo na produção de bicombustíveis da biomassa em larga escala, o Brasil apresenta-se como o país mais avançado nessa tecnologia já que atualmente é o maior produtor de bioetanol do mundo. Neste contexto, o estudo em questão teve como objetivo apresentar a viabilidade da produção de etanol a partir de um hidrolisado eficiente de fécula de mandioca *Manihot esculenta Crantz* que foi obtido com a utilização de amilases recombinantes, sendo uma α-amilase clonada de *Bacillus licheniformis* e expressa em *Bacillus subtilis* e uma glucoamilase clonada de *Aspergillus awamori* e expressa em *Pichia pastoris*, advindas de trabalhos anteriormente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. O hidrolisado obtido foi fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial em sistemas conhecidos como fermentômetros. O hidrolisado resultou em uma concentração de 20 gL^{-1} de etanol em 6 h, com eficiência de hidrólise igual a 57%, produtividade volumétrica 3,33 $gL^{-1}h^{-1}$ e fator de rendimento em substrato consumido de 0,29 gg^{-1}.

Palavras-chave: Etanol; biomassas; amilases recombinantes; fermentação.

ABSTRACT

There some decades the search for alternative energetic sources is mundialy on the focus. For environmental reasons economic and geopolitical this search has been strained and one of the sources of alternative energy that awakens the trend to replace fossil fuels, is the ethanol that is a cleaner fuel. Even more, companies, governments and researchers has been focused their reachers to it. The obtained alcohol by biomass fermentation is called "bioethanol". Brazil's position about the full use of biomass is very privileged because of its greatest world's biodiversity, an intense solar radiation, abundance water, climate's diversity and biomass from biomass products on a large scale, Brazil presents itself as the most advanced country in this technology once it is the currently largest bioethanol producer in the world. In this context the goal of this study is presenting the ethanol's production viability from a efficiently hydrolyzate of cassava starch *Manhiot esculenta Crantz* which was obtained with the recombinant amylases (α-amylase and glucoamylase), resulting from the previous work developed in the research group by OLIVEIRA (2009) and CARMO (2010). The hydrolyzate was fermented by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* commercial yeast on systems known as fermentometers. The hydrolyzate resulted in a 20 gL^{-1} ethanol concentration in 6 h, with hydrolysis efficiency of exceeding 57% volumetric productivity 3.33 $g/L^{-1}h^{-1}$ and yield factor of substrate consumption of 0.29 gg^{-1}.

Key-words: Ethanol, biomass, recombinant amylases; fermentation.

1. INTRODUÇÃO

O último trimestre de 2009 o valor do barril do petróleo atingiu a cifra de 80 dólares. Muitas são as causa que podem ser apontadas para tal acontecimento, sendo algumas delas, a grande instabilidade política no Oriente Médio; política nacionalista apresentada pela Venezuela e Bolívia; o esgotamento das reservas mundiais; crescimento econômico na China e na Índia, etc. Com preços elevados, intensifica-se no mundo inteiro a busca por fontes de energia de matérias-primas alternativas renováveis. Simultaneamente, estudos revelam à elevação das concentrações de gás carbônico na atmosfera acarretando provavelmente o aquecimento global e como conseqüência as regiões da Terra apresentam mudanças climáticas bastante rigorosas. O Brasil pela sua imensa extensão territorial, associada às excelentes condições edafo-climáticas, é considerado um paraíso para produção de biomassa para fins alimentares, químicos e energéticos.

Segundo Pereira (2006) para 2013 a demanda de etanol no Brasil é de 32 bilhoes de litros, porém apenas o álcool produzido a partir do caldo de cana, o chamado etanol de primeira geração, não será capaz de suprir essa demanda, confirmando a necessidade do uso de outras fontes para que seja alcançada.

O amido é um polímero compostos por unidades de glicose repetidas denominadas ligações glicosídicas α (1,4) está dentre as biomassas que são utilizadas para obtenção do etanol. As plantas utilizam o amido como principal reserva de energia, armazenado os carboidratos na forma de grânulos nas sementes, frutos, tubérculos e raízes, dependendo da planta. Segundo Buckeridge et al. (2009) o amido é tido como uma das fontes mais importantes para os níveis subseqüentes da cadeia alimentar dentro dos ecossistemas. Amidos de plantas diferentes divergem em estrutura, assim como amidos de uma mesma planta podem ser diferentes. Trata-se de um substrato renovável, biodegradável e não tóxico amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, têxtil, para a elaboração de compostos farmacêuticos, na produção de resinas naturais e materiais termoplásticos biodegradáveis; sendo que estas últimas aplicações utilizam-se o amido modificado, acetilação, eterificação e a esterificação são alterações que vem sendo usadas para os amidos na indústria de alimentos, papéis e filmes, essas alterações conferem ao amido modificações estruturais que podem ser aplicadas como, por

exemplo, na produção de eletrólitos sólidos poliméricos. (CEREDA; VILPOUX, 2003d; DRAGUNSKI, 2006).

As moléculas de amido, como todas as outras moléculas de polissacarídeos, podem ser despolimerizadas por ácidos a quente, porém para hidrolisar o amido a glicose, são usadas três ou quatro enzimas (FENNEMA, 2010). Diversos organismos apresentam capacidade de produzir enzimas que clivam o amido e assim liberando glicose que é utilizada no metabolismo energético dos mesmos. A glicose, que é o monômero que estrutura o amido, apresenta-se organizada em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina. De acordo com Ball et al. (1998) a amilose se dispõe linearmente praticamente com a ausência de ramificações ao longo de sua cadeia apresentando ligações glicosídicas do tipo α (1,4) e uma parte mínima que não chega a 1% da estrutura tem ramificação α (1,6). Enquanto que a amilopectina é considerada uma das maiores biomoléculas conhecidas, apresenta um número elevado de ramificações e possui cadeias de resíduos de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α (1,4) com aproximadamente 5% de ramificações α (1,6).

Uma grande quantidade e variedades de enzimas encontram-se envolvidas na mobilização do amido, são as chamadas hidrolases. Essas enzimas atacam a estrutura do amido no centro da molécula (endo-enzimas) ou na porção terminal não redutora da molécula (exo-enzimas) (BUCKERIDGE *et al.* 2004). Sendo que a clivagem endo é realizada pela α-amilase (EC 3.2.1.1) na quebra das ligações do tipo α (1,4) interna ao polissacarídeo, ressaltando que a α-amilase atua junto ao granulo de amido intacto; seguidamente oligossacarídeos, que são produzidos após a ação da α-amilase, são clivados pelas exo-enzimas, resultando em monômeros de glicose.

A conversão de glicose a etanol é conhecida como fermentação alcoólica e pode ser considerada como a oxidação anaeróbica, parcial, da glicose, pela ação de leveduras, onde o produto final é álcool etílico e anidrido carbônico, porém alguns produtos secundários também são gerados. Esse é um processo de grande relevância, pois todo o álcool industrial assim como todas as bebidas alcoólicas sejam elas destiladas ou não, são obtidas através dessa conversão (VICENZI, 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O amido

As características químicas e físicas do amido o destacam dos demais carboidratos. Ele é a reserva alimentar predominantes dos vegetais, fornecendo 70-80% das calorias de consumo no mundo. O amido e seus respectivos hidrolisados são constituídos principalmente por carboidratos digeríveis e/ou fermentáveis. Os amidos comerciais são obtidos a partir de sementes de cereais, principalmente de milho comum, milho ceroso, milho de alto teor de amilose, trigo, arroz, tubérculos e raízes, em especial a batata e a mandioca (FENNEMA, 2010). Os amidos modificados apresentam numerosas aplicações, incluindo a promoção de adesão e a função ligante, turbidez, polvilho, elemento de recobrimento (filme de cobertura), reforçador de espuma, gelificante, vitrificante, retentor de umidade, estabilizante, texturizante e espessante (MORAES, 2004; DENARDIN & SILVA, 2008).

Estes polissacarídeos participam de vários processos vitais, sendo a mais importante fonte de energia dietética para os animais e para os seres humanos. Estruturalmente, o amido pode ser considerado como uma homoglucana (ou homopolissacarídeo), pois apresenta como única unidade constitutiva, a glicose como pode ser vista na figura 1 (FENNEMA, 2010).

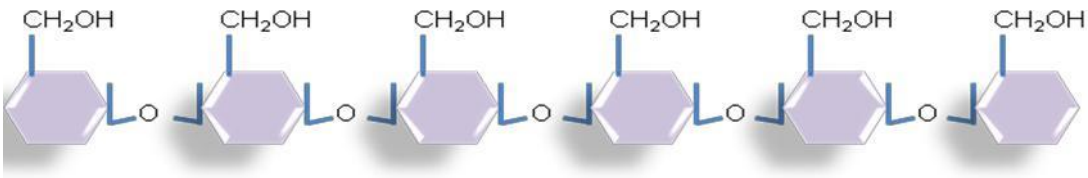


Figura 1: Estrutura Química do Amido (FENNEMA, 2010)

O amido distingue-se entre os carboidratos por ocorrer, na natureza, em partículas características denominadas grânulos. Os grânulos de amido são insolúveis; eles se hidratam muito pouco em água fria. Desse modo, eles podem ser dispersos na água, formando uma suspensão de baixa viscosidade que pode ser facilmente misturada e bombeada, ainda que em concentrações superiores a 35%. A capacidade de aumento de viscosidade (espessante) do amido é obtida apenas quando a suspensão de grânulos é

cozida. Aquecendo-se uma suspensão de 5% dos principais grânulos de amidos nativos a 80ºC, sob agitação, obtém-se uma dispersão de alta viscosidade que pode ser chamada de goma, ou gelatinização. Uma segunda particularidade é que a maioria dos grânulos de amido é composta de uma mistura de dois polímeros: um polissacarídeo linear chamado amilose, e um polissacarídeo ramificado, chamado amilopectina (DENARDIN & SILVA, 2008).

2.1.1. Amilose

Embora a amilose seja essencialmente uma cadeia linear de unidades de α-D-glicopiranosil unidas por ligações (1→4), muitas moléculas de amilose contêm um pequeno número de ramificações ou radicais conectados por ligações α-D-(1→6), nos pontos de ramificação (figura 2). É possível que, uma em 180 a 320 unidades, ou 0,3-0,5% das ligações, sejam ramificações. As ramificações são separadas por longas distâncias, de modo que as propriedades da amilose são aquelas da molécula linear. As moléculas de amilose apresentam massa molecular média de 10^6 (DENARDIN & SILVA, 2008).

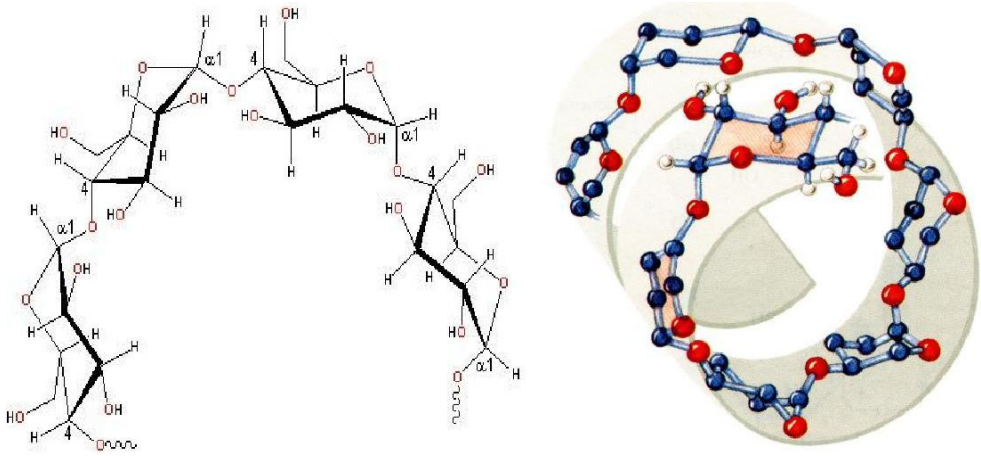


Figura 2: Estrutura química e helicoidal da molécula de amilose (NELSON & COX, 2011)

Seu grau de ramificação depende principalmente do vegetal de origem e do estágio de crescimento (Tabela 1). Nos grânulos de amido co-existem moléculas de amilose estritamente lineares e outras que apresentam ramificações, sendo ambas insolúveis em água.

Tabela 1: Teores de amilose e amilopectina em diversas fontes amiláceas.

Origem	Amilose (%)	Amilopectina (%)
Milho	27	73
Milho Ceroso (“Waxy”)	0-6	94-100
Mandioca	17	83
Batata	20	80
Arroz	17	83
Trigo	25	75

Fonte: Alexander, 1995

A posição axial → equatorial de acoplamento da unidade α-D-glicopiranosil, na cadeia de amilose, confere à molécula uma forma helicoidal, voltada para a direita. O interior da hélice contém predominância de átomos de hidrogênio e é hidrofóbico/lipofílico, enquanto no externo da hélice estão posicionados os grupos hidroxila. A vista inferior do eixo da hélice é muito parecida com a vista inferior de uma seqüência de moléculas de α-ciclodextrina, uma vez que cada volta da hélice contém cerca de seis unidades de α-D-glicopiranosil unidas por ligações (1→4). A maioria dos amidos contém cerca de 25% de amilose (SALGADO, et al., 2005).

2.1.2. Amilopectina

A amilopectina é uma molécula de cadeia longa e altamente ramificada. Seus pontos de conexão das ramificações constituem entre 4 a 5% do total de ligações, sendo um carboidrato constituído de uma cadeia que contém apenas grupos redutores terminal, nos quais estão ligadas numerosas cadeias ramificadas, sendo que nessas últimas, estão ligadas a várias camadas de cadeias ramificadas. As ramificações das moléculas de amilopectina são agrupadas e apresentam-se como hélices duplas (Figura 3). A massa molecular de 10^7 (DP~60.000) até, possivelmente, 5×10^8 (DP~3.000.000) faz com que a amilopectina esteja entre as maiores, se não a maior, das moléculas encontradas na natureza.

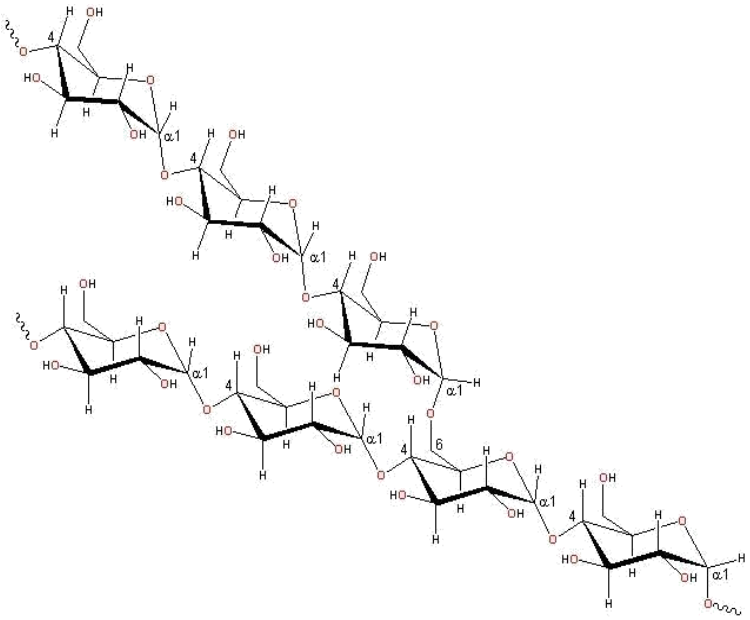


Figura 3. Estrutura química da amilopectina (NELSON & COX, 2011)

A amilopectina está presente em todos os amidos. Ela constitui mais ou menos 75% da maioria dos amidos comuns. Alguns amidos são constituídos inteiramente de amilopectina, sendo denominados como cerosos ou amidos de amilopectina. O milho ceroso, primeiro grão reconhecido entre os que contêm amido constituído apenas por amilopectina, é assim denominado porque, quando cortado, a superfície do miolo do grão apresenta aparência vítrea ou cerosa. A maioria dos outros amidos constituídos apenas de amilopectina é chamada de ceroso, embora, no caso do milho não haja cera em sua constituição. A amilopectina de batata é a única, entre os amidos comerciais, a possuir mais do que quantidades-traço de grupamentos éster fosfato. Esses grupos éster fosfato encontram-se ligados com mais freqüência (60-70%) a uma posição O-6, com outro terço na posição O-3. O grupo éster fosfato ocorre aproximadamente uma vez a cada 215-560 unidades de α-D-glicopiranosil (DENARDIN & SILVA, 2008).

2.2 Fécula de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta heliofila, perene, arbustiva, pertencente à família das euforbiáceas. É tolerante a seca e possui ampla

adaptação as mais variadas condições de clima e solo. A parte mais importante da planta são as raízes tuberosas, ricas em amido, que são utilizadas na alimentação humana e animal ou como matéria-prima para diversas indústrias. Originária do continente americano, provavelmente do Brasil Central, a mandioca já era amplamente cultivada pelos aborígenes, por ocasião da descoberta do Brasil. A mandioca (*Manihot esculenta*) é a sexta mais importante cultura de produção de alimentos do mundo, sendo que na região tropical torna-se a principal. Segundo a Organização para Agricultura e Alimentos (FAO, sigla em inglês) sua raiz e seus subprodutos são consumidos por mais de 800 milhões de pessoas (SILVA, 2010).

O Brasil há pelo menos dez anos situa-se entre os cinco maiores produtores mundiais de mandioca, também conhecida como macaxeira, aipim ou castelinha. Segundo Prado (2002) é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do País, em termos de área cultivada, e o sexto em produção. As investigações de campo, do mês de dezembro de 2010 realizadas pelo IBGE, indicaram para a cultura da mandioca a ser colhida em 2011, uma área da ordem de 1,9 milhão de hectares, que é 5,1% maior que a área colhida em 2010. A produção nacional de mandioca para 2011 foi estimada em 27,1 milhões de toneladas, variação positiva de 9,2% em relação à safra de 2010, não havendo diferenciação entre o destino da produção de raízes, na coleta de dados, sendo ela para a indústria ou para o consumo doméstico (mandioca de mesa).

Uma parte da produção é destinada à obtenção de farinha ou usada diretamente no consumo alimentar e o restante é destinado à industrialização, que consiste basicamente na extração de amido. O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca, participando com 12,7% do total. A mandioca é cultivada em todas as regiões do Brasil, assumindo destacada importância na alimentação humana e animal, além de ser utilizada como matéria-prima em vários seguimentos da economia como pode-se observar na figura 4 da Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca (ABAM, 2011) a evolução da produção de fécula de mandioca nos últimos anos.

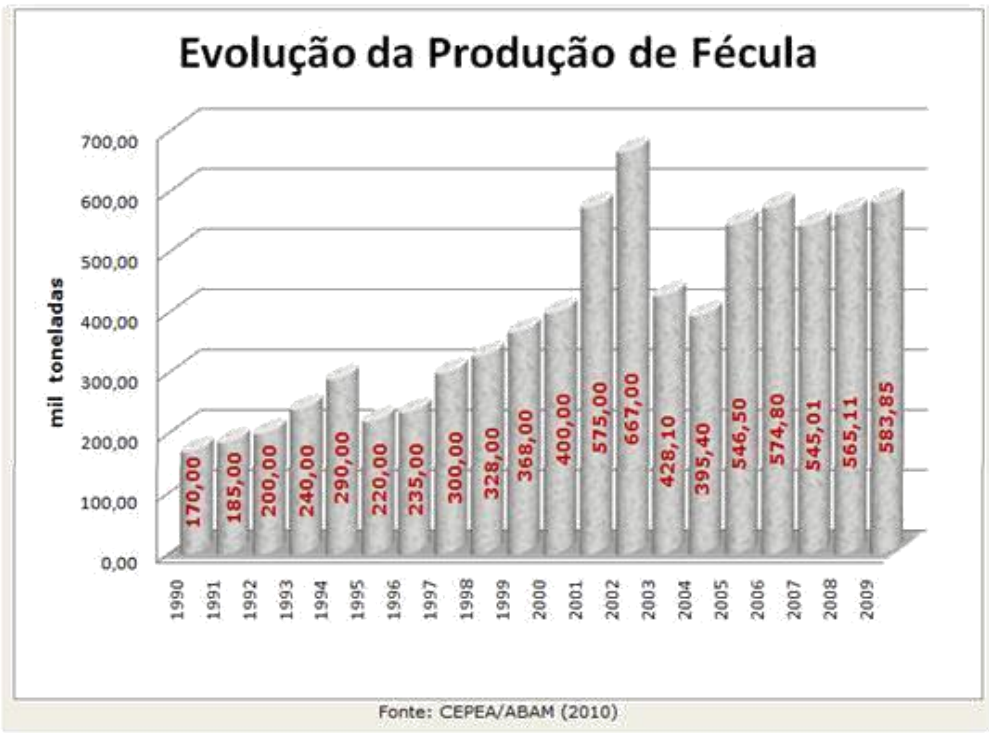


Figura 4. Evolução da Produção de fécula (CEPEA/ABAM, 2010)

Sumerly et al., (2003) apontou o Brasil sendo um dos principais produtores mundiais de mandioca, com transformação industrial da raiz em farinha e fécula. Nos países europeus e nos Estados Unidos, mais de 50% da produção de amido é destinada à produção de hidrolisados como glicose, maltose, dextrinas e maltodextrinas. A *Corn Products* e a *Cargill*, duas multinacionais dos Estados Unidos com filiais no Brasil, são as maiores produtoras de hidrolisados, porém assim como as demais empresas mundiais do setor, utilizam como matéria-prima apenas amido de milho.

Segundo Filho & Mendes (2003) a mandioca apresenta, dentre outras matérias-primas, características com alta potencialidade para produção do bioetanol, já que a mesma contém alto teor de amido, tradição de cultivo em grandes áreas do Brasil, ressaltando que o nosso país foi o pioneiro na tecnologia da produção do álcool de mandioca nos idos anos de 1932/45 e também na década de 70. Muitas são as vantagens da cultura de mandioca quando comparada, por exemplo, com a cana-de-açúcar que há muitos anos seu potencial agronômico vem sendo desenvolvido e que atualmente os incrementos em produtividade dessa cultura estão cada vez menores e a custos elevados,

enquanto que a mandioca ainda tem muito espaço a ser conquistado principalmente no que diz respeito à produtividade agronômica. Outro ponto favorável ao uso da mandioca para a produção de bioetanol, é que a mesma pode ser cultivada em diferentes tipos de solo, sendo assim pode ser cultivada inclusive em áreas que apresenta improdutividade para outros tipos de culturas.

Atualmente diversos estudos estão sendo desenvolvidos a favor da cultura da mandioca pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Alguns pesquisadores da EMBRAPA em viagens de coletas de algumas espécies de plantas na Amazônia depararam-se com uma variedade de mandioca que, ao invés de suas raízes conterem amido, apresenta uma grande quantidade de açúcares. Sendo que dos açúcares presentes o de maior quantidade é a glicose; a utilização dessa mandioca açucarada para a obtenção de alcoóis, tornaria o processo de hidrólise do amido desprezível eliminando assim etapas do processo de transformação de açúcares em alcoóis (ERENO, 2008).

A Legislação brasileira é uma das poucas do mundo a distinguir o amido da fécula. Segundo a legislação denomina-se amido a fração que é extraída das partes aéreas das plantas e a fécula sendo a fração amilácea extraída de raízes, tubérculos e rizomas (LIMA, 2001). Porém Coelho (2004) classifica, em tecnologia, a fécula como sendo o amido de raízes e tubérculos, sendo que a fécula de mandioca é obtida a partir da mandioca lavada e descascada, ralada para a extração, sendo o bagaço e o leite de fécula separados e, o bagaço será usado em ração animal e o leite purificado por decantação, só então a fécula é embalada, no entanto ambos são amidos

2.2.1 Composição química do amido de mandioca

Fermentados ou não, os principais produtos da mandioca são ricos em amido constituinte que se apresenta como principal fonte de energia da mandioca. Na Tabela 2, apresenta-se a composição química da raiz de mandioca (CEREDA & VILPOUX, 2002).

De modo geral, o amido de mandioca constitui-se do polissacarídeo praticamente puro, contendo aproximadamente 0,34 % de proteína, 0,22 % de gordura e 0,06 % de cinzas.

Tabela 2: Composição química da raiz de mandioca

Componentes	Composição
Amido	82,50 %
Açúcares	0,20 %
Fibras	2,70 %
Proteínas	2,60 %
Matéria graxa	0,30 %
Cinza	2,40 %

Fonte: Adaptado de CEREDA & VILPOUX (2003). V 1, p. 78)

2.2.2 A produção de bioetanol a partir da mandioca

Historicamente em momentos de crises econômica, de guerra e energética o Brasil já utilizou a mandioca para a produção de álcool. Porém, de acordo com Ostrowski et al. (2006), passado esses momentos abandonou-se essa prática onde a mandioca era a matéria-prima e prevaleceu o uso da cana-de-açúcar para a produção do etanol.

Quimicamente o álcool etílico hidratado não apresenta diferença quanto às matérias-primas utilizadas como a cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca, as diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o álcool, que são características de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto. O álcool fino constitui-se principalmente em bem de produção intermediário, ou seja, é a matéria-prima para as indústrias de bebidas, perfumaria, farmacêutica e eventualmente indústrias químicas e alimentícias (FENNEMA, 2010).

A fermentação da glicose é a forma mais comum de obtenção de bioetanol industrialmente. Sendo assim toda matéria-prima que apresente carboidrato derivados da glicose podem ser transformados em bioetanol por via fermentativa, no entanto a glicose deve estar disponível para que a fermentação alcoólica ocorra. Já que na fermentação são utilizadas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e as mesmas não apresentam capacidade de converter o amido diretamente em bioetanol, com isso o amido precisa passar por algumas etapas até que o amido seja convertido em açúcares fermentecíveis, etapas essas denominadas de hidrólise ou dextrinização e sacarificação, realizadas por α-amilase e glucoamilase, respectivamente (CUNHA, 2009 e ZIM, 2010).

2.3. Produção de etanol no Brasil

2.3.1 Uso e Produção de Etanol no Brasil

Estudos e testes com combustíveis alternativos e renováveis, tais como o álcool de cana-de-açúcar, foram realizados no Brasil desde a década de 1920. Em 1903 uma infra-estrutura para a produção e uso de álcool, foi proposto pelo 1º Congresso Nacional de Aplicação Indústria do álcool, de fato durante a Primeira Grande Guerra seu uso foi compulsório em muitas áreas do País. Em 1923, foi alcançada uma marca de 150 milhões de litros por ano. A partir de 1927 o etanol passou a ser misturado com éter dietílico (etílico) e óleo castor. (MOREIRA & GOLDENBERG, 1999; CAMPOS, 2003; NEGRÃO & URBAN, 2005).

2.3.2 Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL)

Segundo Moreira & Goldenberg (1999) uma decisão política e econômica, envolvendo investimentos adicionais, do uso da cana-de-açúcar para a produção de etanol, em adição ao açúcar, foi tomada pelo Governo Federal, com o PROÁLCOOL, implementando em escala comercial no final dos anos 70. Goldenberg et al. (2004) relata que datada de 1975, esta decisão foi tomada quando a economia brasileira estava bastante afetada pela crise mundial do petróleo ao mesmo tempo em que no mercado internacional o preço do açúcar declinava muito rápido, fazendo com que a produção de álcool ficasse mais atrativa. Como resposta a este abalo econômico, foi criado o Programa de incentivo à produção de etanol, com o intuito de posteriormente substituir a gasolina por este biocombustível.

Em 1975, ao ser criado, o PROÁLCOOL previa sua total implantação com a passagem de três fases, a saber: primeiramente, a meta era de se produzir uma quantidade suficiente de álcool que seria usado como aditivo à gasolina na proporção de 1:4, principalmente para a movimentação da frota de veículos pequenos. Em sequencia objetivava-se uma produção capaz de movimentar sozinha boa parte desta frota. Finalmente, nos meados dos anos 80 o Programa estaria completo com a perspectiva da produção não só álcool e açúcar, mas também de se explorar ao máximo os subprodutos gerados durante o processo de obtenção do álcool. O programa mostrou auto-suficiência para sua implantação, porém a queda nos preços do petróleo fez com que o

PROÁLCOOL passasse por anos de dificuldade. Com isso, a terceira etapa do programa foi esquecido pelo governo, sendo resgatada há poucos anos (PEREIRA JR, 2012).

Segundo Tosta (2004) a produção brasileira de etanol através de processos fermentativos era insignificante no contexto da industrialização da cana-de-açúcar isso antes do advento do PROÁLCOOL, produção esta que com o Programa situou-se na faixa de 600 milhões de litros por safra. A produção de cana-de-açúcar e álcool no Brasil entre 1975 e 1985 quadruplicou e, isso fez com que o etanol tornasse-se o mais importante combustível. Não obstante, a dinâmica que sustentava a oferta e consumo brasileiro do etanol carburante continuamente esteve pressionada pela competição dos preços oscilantes do petróleo no mercado internacional e, sobretudo pela maior atratividade da *commoditie* açúcar. O que culminou com a desaceleração do programa na década de 90 acarretando uma marcante diminuição da frota de carros 100% movidos a álcool e a desestabilização conjuntural do modelo. Pois as medidas necessárias para a garantia da estocagem e oferta do etanol, exigia à época um complexo sistema de regulamentação, que não foi possível de ser adotado (NEGRÃO & URBAN, 2005).

Segundo CARVALHO (2006) citando CAMPOS (2003) devido ao desafio de competitividade estabelecido pelos preços do petróleo e dos óleos vegetais e visando atender às preocupações ambientes existentes, a década de 90 caracterizou-se pela produção comercial e instalação de plantas de produção de bicombustível em escala industrial (CAMPOS, 2003).

Ainda segundo CARVALHO (2006) a medida eficaz que garantiu a efetiva produção de etanol até os dias de hoje, a despeito da desaceleração do PROÁLCOOL nos anos 90, foi a mistura do etanol anidro carburante na gasolina, o que compensou a queda no consumo do álcool hidratado (NEGRÃO & URBAN, 2005).

2.4 Enzimas amilolíticas ou modificadoras de amido

Desde o início do século, o estudo da viabilidade de aplicação das enzimas em processos biotecnológicos tem tido um grande destaque em nível Mundial. Dentre estas enzimas, podemos destacar como as mais importantes para a biotecnologia; até o momento, as enzimas α e β amilases, amiloglucosidase e pululanase. O uso fundamental

das amilases está na hidrólise do amido, principalmente, na indústria de panificação; no pré-cozimento de cereais, nas indústrias de fermentação, para a produção de álcool e bebidas alcoólica; na fabricação de xaropes de glicose, via hidrólise pelas amilases; no preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos, dentre outros.

As enzimas que atuam sobre o amido são usadas principalmente para aplicações em mercadorias, tais como produção de xaropes de milho, dextrinas, xaropes de milho ricos em frutose, e outros adoçantes como xaropes maltose e glicose. As transformações do amido também são desejáveis em uma extensão mais limitada em produtos de panificação; as glicosidases exógenas são adicionadas com o objetivo de retardar a retrogradação e facilitar a fermentação por leveduras (FENNEMA, 2010).

Diversas são as fontes de obtenção das amilases, como plantas, micro-organismos e animais. Segundo Guandalini (2007) encontra-se uma grande quantidade de amilases microbianas disponíveis comercialmente o que está fazendo diminuir sensivelmente a hidrólise química do amido.

2.4.1 α amilases

A enzima com código e nome sistemático EC 3.2.1.1; α-1,4 glicano 4-glicano-hidroxilase, respectivamente, é comumente conhecida como α-amilase. É uma endoenzima, de ação retentora α → α responsável, em especial, por reduzir rapidamente a massa molecular média de polímeros de amido.

Ela é o membro representativo da família 13 das glicoamilases, sendo que várias delas são usadas no processamento de amidos. Essa família é caracterizada por ter pelo menos três domínios separados dentro da proteína, um para catálise, outro para servir de sítio de ligação para amido granular e o terceiro para fornecer ligação para o cálcio e ligar os outros dois domínios. O tamanho molecular da enzima de diversas fontes, mais de 70 sequências foram relatadas, tipicamente está no intervalo de 50-70 kDa; embora algumas possam chegar a 200 kDa (FENNEMA, 2010).

A α-amilase é definida por Pandey et al (2005) como sendo a enzima que quebra as ligações α(1,4) dos polissacarídeos que apresentam três ou mais unidades de D-glucose em união α-1,4. O ataque ocorre de forma randômica, e não seletiva, sobre vários pontos da cadeia ao mesmo tempo, e o produto dessa hidrólise são oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Entende-se que esse ataque é

preferencialmente feito sobre cada passo da hélice, da cadeia espiral da amilose ou da amilopectina.

Muitos pesquisadores há anos dispensam atenção às α-amilases por elas apresentarem alta termoestabilidade, no entanto a liquefação do amido por aquelas enzimas faz com que o custo na unidade operacional seja a mais cara dentro desse processo, por isso hoje a biotecnologia empenha-se na produção de α-amilases termoestáveis de menor custo (CUNHA et al., 2009).

Existem diversas fontes de α-amilases, a maioria microbiana, embora amilases de malte (cevada ou trigo) estejam disponíveis. Os produtos finais típicos da ação das α-amilases são α-dextrinas-limite ramificadas e malto-oligossacarídeos de 2-12 unidades de glicose, predominantemente na parte superior desse intervalo (WHITAKER, 2003; WHITEHURST, 2002). A viscosidade do amido é reduzida com rapidez devido à natureza randômica da hidrólise, diminuindo em pouco tempo a massa molecular média das cadeias de amilose/amilopectina. A Figura 5 apresenta o mecanismo de degradação prolongada dos componentes do amido pela ação da α-amilase.

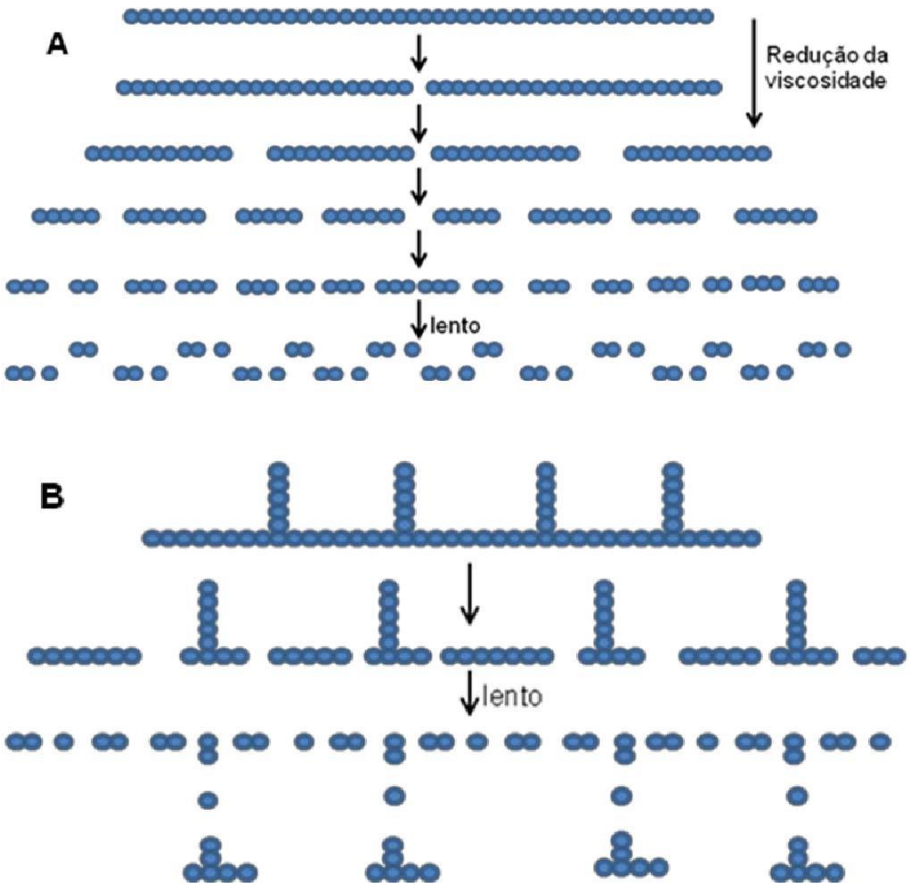


Figura 5. Mecanismo de ação da α-amilase sobre os componentes do amido. (A) Amilose; (B) Amilopectina (BARCELOS, 2010 - adaptado)

Entre as amilases microbianas, os parâmetros ótimos geralmente são encontrados em intervalos de pH entre 4-7 entre 30-130 ºC (PANDEY et al., 2005). Poucas amilases com pH ótimo alcalino de 9-12 despertam interesse particular, não necessariamente como auxiliares de processo em alimentos, mas a partir da perspectiva de que deve existir uma alternativa para a propriedade bem conservada da díade ASP/GLU das glicosidases.

As fontes comerciais comuns para transformação de amido incluem as α-amilases de espécies de *Bacillus* e *Aspergillus*. As de *Bacillus* são termoestáveis e podem ser usadas entre 80-110ºC em pH entre 5-7 e 5-60 ppm Ca^{2+} (WHITEHURST, 2002). As enzimas de fungos *Aspergillus* funcionam em condições ótimas entre 50-70ºC, pH 4-5 e ~ 50 ppm Ca^{2+} (PANDEY, 2000; WHITEHURST, 2002).

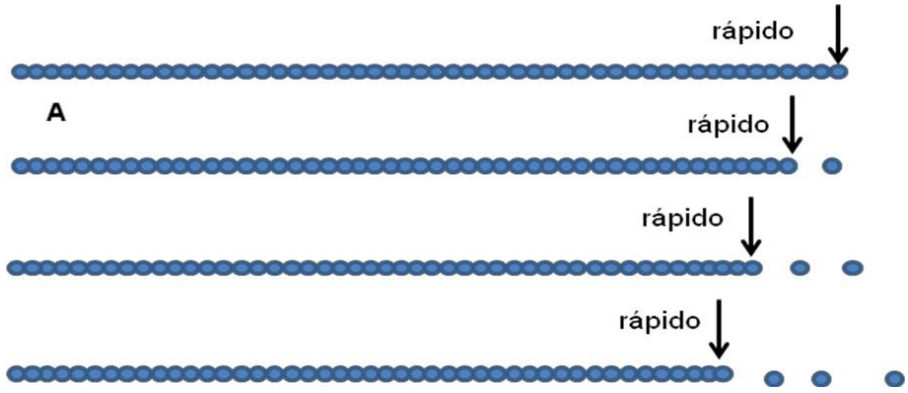
Como as α-amilases de fungos também são endoglicosidases, elas tendem a favorecer a acumulação de malto-oligossacarídeos menores (*n* = 2-5) como produtos finais da liquefação do amido (TUCKER, 1995). Uma α-amilase "maltogênica" única de *Bacillus* (EC 3.2.1.133) também foi identificada (CHRISTOFERSEN et al., 1998) e, enquanto a produção de maltose é mais associada a ação de β-amilases, as β-amilases maltogênicas parecem resultar em maiores níveis de maltose como por diversos episódios hidrolíticos sobre uma cadeia de amilose antes de sua dissociação completa do sítio ativo (DAUTER, 1999).

2.4.2 Glicoamilases

A glicoamilase (1,4-α-D-glicano glicano-hidrolase, EC 3.2.1.3), também conhecida como amiloglicosidase, é uma exoenzima α→β inversora incluída de forma isolada na família 15 das glicosidases, que hidrolisa unidades de glicose a partir da extremidade não redutora de fragmentos lineares de amido. Embora a glicoamilase seja seletiva para ligações α-1,4-glicosídica, ela pode agir devagar sobre as ligações α-1,6 características da amilopectina e da pululana. Logo, o produto exclusivo da digestão exaustiva da glicoamilase é a glicose. Ela tem propriedades estruturais e mecanismo similares aos da α-amilase, incluindo os resíduos catalíticos respectivos ácido e base GLU_{179} e GLU_{400} (tendo-se a enzima de *Aspergillus* spp. como referência), um domínio separado para ligação de amido e um domínio de união curto. Algumas glicoamilases podem agir sobre amido nativo (cru) granular dois resíduos $TRP_{52,120}$ assistem a catálise por formação de ligações de H com GLU_{179}, aumentando sua acidez (SINNOTT, 1998).

O domínio catalítico tem cinco subsítios diferentes do resíduo de hidrólise da glicona em -1, e os subsítios +1 a +5 exibem -Δ*G* para ligação (favorável), especialmente no subsítio +1. Como Δ*G* é incremental para os subsítios, a enzima tem maior seletividade de reação para o maior dos glico-oligossacarídeos lineares C2-C6+. Esse padrão de seletividade é condutivo para a obtenção de hidrólise exaustiva de segmentos curtos de amilose para glicose. Os substratos oligoméricos devem entrar em um "poço" para ter acesso ao sítio ativo e, devido a essas limitações espaciais, a dissociação e a nova ligação do resto do substrato é a etapa limitante da velocidade da reação, em detrimento da etapa de hidrólise (FENNEMA, 2010).

As glucoamilases são enzimas liquidificantes e sacarificantes, que atacam as ligações α (1→4) a partir das extremidades não redutoras liberando moléculas de D-glicose. A hidrólise ocorre também nas ligações α (1→6) (atividade desramificadora) mas em proporção menor da que ocorre nas ligações α (1→4). Estas enzimas são raras em bactérias e de grande ocorrência em fungos dos quais são produzidas comercialmente. A Figura 6 apresenta o mecanismo de degradação da amilose a amilopectina pela ação da glucoamilase (BARCELOS, 2010).



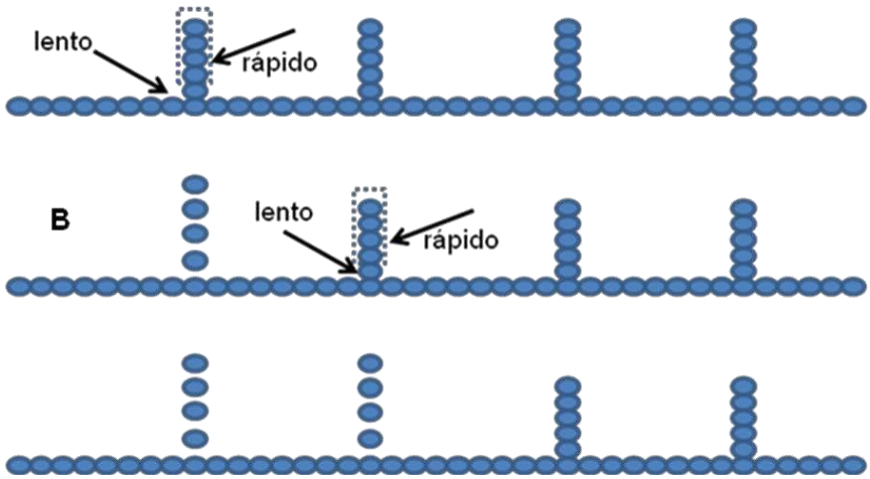


Figura 6. Mecanismo de ação da glucoamilase sobre os componentes do amido. (A) Amilose; (B) Amilopectina (BARCELOS, 2010 - adaptado)

As fontes primárias de glicoamilases são bactérias e fungos (PANDEY et al., 2005); elas apresentam massas no intervalo de 37 a 112 kDa, podem existir sob múltiplas isoformas, não têm cofatores, e exibem pHs ótimos no intervalo de 3,5-6,0 a 40-70ºC. A glicoamilase de *Aspergillus* é comumente usada, sendo mais ativa e estável em pH 3,5-4,5, com temperatura ótima entre 55-60ºC (WHITAKER, 2003). A enzima de *Rhizopus* é de interesse, pois uma isoforma também pode hidrolisar com facilidade os pontos de ramificação α-1,6 (PANDEY et al., 2005). As glicosidases são relativamente lentas em relação a outras envolvidas na transformação de amido, sendo que os esquemas de processamento têm evoluído no sentido de acomodar essa propriedade.

As frações de amilose e amilopectina do amido não são as únicas moléculas que podem ser hidrolisadas pelas glicoamilases, segundo Costa (1996) citado por Spier (2005) a enzima ainda hidrolisa outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio, pois a mesma também atua sobre as ligações α-1,3. A glicoamilase é uma enzima de indução, sendo importante a presença de maltose ou amido no meio para sua alta produção. Como a enzima é chamada de indução não típica, o micro-organismo a sintetiza, mesmo se crescer em glicose como fonte de carbono, ainda segundo aqueles autores. Em 1977 Park & Santi já haviam constatado a presença da enzima no sangue, no malte da cevada e também em meios de crescimento de bactérias; porém como já citado anteriormente também são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, já que a enzima produzida por esses fungos aponta menos formação de

produtos de reversão que a hidrólise ácida, bem como à sua alta taxa de conversão do polissacarídeo em glicose, por isso cada vez mais essas enzimas vem assumindo grande importância industrial. Assim, a glicoamilase é usada em amidos liquefeitos com α-amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas.

2.4.3 α amilase recombinante

Segundo Gangadharan et al (2008) a α-amilase de *Bacillus licheniformis* apresenta uma utilização bastante expressiva nas indústrias de processamento de amido, pois a mesma tem a capacidade de hidrolisar o amido em temperaturas relativamente altas, podendo ultrapassar os 90 °C, e de possuir considerável estabilidade em altas temperaturas. *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva caracterizada por ser um microrganismo "GRAS" e por possuir a capacidade de secretar grande quantidade de proteínas para o meio de cultivo, diante dessas características esta bactéria torna-se um hospedeiro bastante satisfatório quando se pretende expressar proteínas recombinantes de interesse industrial (SHUMMANN et al., 2007). A α-amilase deste estudo foi clonada e expressada com o gene que codifica α-amilase de *B. licheniformis* em *B. subtilis*. Segundo Oliveira (2009), o gene, *amy*L, que codifica α-amilase de *B. licheniformis* DSM13 foi amplificado a partir do genoma desta linhagem e clonado em um vetor de clonagem pGEM T-easy e em seguida sub-clonado no vetor de expressão e secreção pHT43, formando um novo vetor denominado pHTamy. Linhagens de *B. subtilis* AmyE e 1012 foram transformadas com o vetor pHTamy pelo método de transformação natural, alcançando uma eficiência de 93 e 257 cfu/μg de DNA, respectivamente. Todos os clones obtidos produziram halos de hidrólise de amido na presença de IPTG 1 mM. O clone denominado BSamyE-14 foi selecionado para produção e caracterização da α-amilase, que apresentou máxima produção em 7 horas de cultivo em meio LB na presença de IPTG 1 mM em 37°C a 150 rpm. A α-amilase, produzida no presente estudo, tem máxima atividade em pH 7,00 em 90°C e retém cerca de 77% da atividade máxima quando incubada por 1 hora a 90°C na presença de $CaCl_2$ 5 mM para manter sua estabilidade.

2.4.4 Glicoamilase recombinante

A glucoamilase é uma das principais enzimas responsáveis pela hidrólise do amido para a formação de xarope de glicose, matéria-prima utilizada pela indústria de alimentos e como fonte de carbono em processos fermentativos diversos (BON et al., 2008). A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido utilizada com sucesso para expressão de várias proteínas de interesse biotecnológico (AYED et al., 2008). Segundo CARMO (2010) que avaliou o sistema de expressão heteróloga utilizando a levedura *P. pastoris* para a produção da referida enzima; o cDNA da glicoamilase isolado do fungo *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1 foi inserido no genoma de *P. pastoris* utilizando o vetor de expressão pPIC9, baseado no promotor AOX, gerando clones recombinantes de fenótipos Mut+ e MutS cultivados sob agitação constante para a produção e secreção da proteína. As atividades das enzimas foram avaliadas utilizando o método DNS para a quantificação dos açúcares redutores resultantes da clivagem das moléculas de amido. A enzima em questão apresentou máxima atividade enzimática, no sobrenadante bruto do clone com fenótipo Mut+ e do clone transformante MutS, de 7.7 U/mL e 6.9 U/mL, respectivamente. Ambos os clones secretaram glucoamilases com 116 kDa, e mesmo apresentando diferentes poder catalítico, bioquimicamente mostraram-se semelhantes, tendo como temperatura de atividade ótima 60ºC, elevada ação catalítica em pH ácido que varia de 4.5 a 2.5 com atividade máxima em pH 3.5 e suas estabilidades frente ao pH do meio de reacional, possuindo portanto, características desejáveis para uso em alguns processos bioindustriais. Os produtos mantém-se estáveis quando os extratos brutos permanecem incubados a temperatura de 4 ºC por 60 dias, mantendo perto de 100% da atividade máxima.

2.5 Hidrólise Enzimática do Amido

Os amidos apresentam ampla utilização industrial na sua forma nativa, porém cada vez mais, vem sendo utilizado após modificações na sua estrutura. Tais modificações podem ser feitas por dois processos: biológicos ou químicos. A hidrólise de amido por processos biológicos, a etapa subseqüente à gelatinização é conhecida como liquefação. O processo biológico prevalece frente aos processos químicos por apresentar menor consumo de energia, pouca geração de compostos secundários, simplificação na linha de produção com reatores unitários que são utilizados de forma

concomitante tanto para liquefação quanto para a sacarificação e, principalmente, à disponibilidade cada vez maior de enzimas amilolíticas (BARCELOS, 2010).

A hidrólise enzimática do amido começa com a quebra limitada das ligações glicosídicas produzindo entre 15 e 30% de açúcares de pequena massa molecular, chamados de dextrinas. Esta primeira etapa é catalisada pelas endoamilases, como a α-amilase (LIU, 2005).

Após a liquefação ocorre a sacarificação, que é a hidrólise total das moléculas em unidades de glicose. Esta reação é catalisada pelas exoamilases, como a glicoamilase, que retira os monômeros de glicose das extremidades não redutoras da cadeia. O período de tratamento enzimático e a concentração de enzimas para a sacarificação do amido vão depender do tipo de hidrolisado que se pretende obter.

No entanto, a classificação de amilases requer a utilização de substratos específicos e análise dos produtos finais formados. Como para outras enzimas, atividades podem ser quantificadas avaliando-se as quantidades de substratos hidrolisados ou de produtos finais formados. Em geral, são utilizadas, para determinação de atividades amilolíticas, as propriedades de decréscimo da viscosidade da solução de reação; aumento do poder redutor da solução de reação; e avariação da intensidade de cor de reação, resultante da formação de complexo iodo-amido. Tais atividades podem ser expressas em poder liqueficante; poder sacarificante; e poder dextrinizante (BARCELOS, 2010).

Os principais tipos de enzimas envolvidas na hidrólise do amido e as respectivas características estão apresentados na Tabela 3. Alguns compostos aromatizantes também se complexam como amido, resultando em redução da percepção, em alimentos amiláceos. Na ligação de alguns compostos ao amido, principalmente à amilose, as moléculas parecem estar complexadas com efeitos competitivos, sinérgicos e antagônicos. Entretanto, a principal razão de todos os polissacarídeos (amidos e gomas alimentícias) reduzirem a percepção de sabores e aromas é a limitação da difusão de moléculas de aroma e sabor para a superfície, devido ao aumento de viscosidade conferido por amidos e gomas (FENEMMA, 2010).

Tabela 3. Enzimas envolvidas na hidrólise do amido

Tipo	Nome comum	**Microrganismos** produtores	Substrato	**Ótimo** pH	T ºC
Endoamilase	Amilase	*B. subtilis*	α-1,4-glicosil	6,0	65-70
	bacteriana	*B. licheniformis*	α-1,4-glicosil	5,0 – 7,0	90
		A.Oryzae	α-1,4-glicosil	4,5	50-60
Exoamilase	Amilase fúngica	*A. Níger*	α-1,4-glicosil	4.0-6.0	60
	Amiloglucosidade		α-1,6-glicosil		
		Bacillus sp	α-1,4-glicosil	5.0	55-60
	α-amilase	*Clostridium sp*	α-1,4-glicosil	5.5-6.0	75-85
	Bacteriana				
α-1,6 amilase	Pululanase	*K. aerogenes*	α-1,6-Maltotriosil	5.0	60
	Isoamilase	*Pseudomonas sp.*	α-1,6-Heptasac	4.0	50-55
Isomerase	Glicose isomerase	*A. Circulans*	Aldo/ceto pentose	8.2	65
			Aldo/ceto hexose		

Fonte: FENEMMA, 2010.

2.6 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é uma transformação bioquímica de glicídeos a etanol e CO_2 retidado pela célula viva, particularmente por células de leveduras e fungo amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias ou anaeróbias. Esta característica classifica estes microrganismos como facultativos para o oxigênio (NELSON & COX, 2011).

A levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* é industrialmente o principal agente biológico da fermentação alcoólica. Na ausência de oxigênio, esses microrganismos apresentam um desvio da via glicolítica (*Embden-Meyerhof-Parnas*) ao nível do piruvato, descarboxilando-o para formação de acetaldeído que posteriormente é reduzido a etanol. Porém a levedura é capaz de fermentar mesmo em presença de oxigênio, mas o meio precisa de concentrações altíssimas de açúcares. O agente biológico mais apropriado para a fermentação alcoólica deve ser selecionado, quando se tenciona transferir o bioprocesso para a escala industrial, em função das seguintes

propriedades: elevada atividade, ou seja, ser capaz de converter rapidamente o substrato em produto com altos rendimentos, conduzindo a altos valores de produtividade; estabilidade sob condições ambientais extremas (elevada pressão osmótica do meio, elevada temperatura, elevada força iônica), devendo, ainda, ser tolerante e resistente a substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria prima ou encontradas em resíduos e efluentes (MÜLLER, 2008).

Os microrganismos mais indicados para produção de etanol a partir de açúcares são as leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* e a bactéria *Zymomonas mobilis*. No gênero *Saccharomyces* destacam-se as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*) (NELSON & COX 2011).

O setor alcooleiro no Brasil e nos Estados Unidos da América utiliza as leveduras do gênero *Saccharomyces*, predominantemente a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e suas diversas linhagens de grande adaptação às condições industriais (CEREDA, 2003).

S. cerevisiae é um microrganismo "domesticado" a milhares de anos e seu uso na produção de vinho, cerveja, pão e, mais recentemente, de proteínas heterólogas permitiu a seleção de inúmeras linhagens que geram diferentes subprodutos, que contribuem para o aroma e sabor de bebidas e alimentos, além de apresentarem muitas delas grande produtividade e tolerância ao etanol. A competitividade de *S. cerevisiae* deve-se a uma combinação de muitas propriedades incluindo crescimento rápido, eficiente utilização de glicose e boa habilidade de produzir etanol, bem como alta tolerância à alta concentração de etanol e requerimento de baixos níveis de oxigênio (MÜLLER, 2008; BARCELOS, 2010).

É importante observar que as condições de cultivo que proporcionem o máximo de crescimento celular podem não ser necessariamente aquelas que proporcionem o máximo de rendimento de algum produto do metabolismo (VICENZI, 2009).

Segundo Nelson & Cox (2011) a primeira etapa da fermentação alcoólica, uma vez efetuada a entrada de D-glicose ou de D-frutose na célula, é a fosforilação do açúcar. As enzimas hexoquinase fosforilam estes açúcares, porém com rendimentos diferentes (razão de 3:1 em favor da D-glicose) enquanto que a glucoquinase fosforila exclusivamente a D-glicose. Estas diferenças explicam por que a D-glucose é consumida a uma velocidade maior que a D-frutose no decorrer da fermentação, e como conseqüência, ao final da fermentação, a concentração relativa da D-frutose é mais elevada que a da D-glicose. O mecanismo metabólico dos açúcares fosforilados é

baseado na sua transformação em piruvato através da via clássica da glicólise. O piruvato está principalmente orientado à produção de etanol para regenerar o cofator NAD^+ consumido ao nível de gliceraldeído-3-fosfato. O piruvato é então descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, depois este é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. O balanço global da fermentação alcoólica é dado pela seguinte equação:

1 Hexose ($C_6H_{12}O_6$) + 2ADP + 2 Fosfatos → 2 Etanol (C_2H_6O) + 2 CO_2 + 2 ATP

Conversão estequiométrica da molécula de glicose em etanol e anidrido carbônico

Durante a fermentação alcoólica também são produzidos outros metabólitos fermentativos e biomassas. Nesta condição, a produção de células é sempre pequena quando comparada com a quantidade de açúcares convertidos em etanol e gás carbônico. Quando o meio é inoculado com uma levedura, a produção de etanol não é imediata. Certas enzimas essenciais na fermentação alcoólica (piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase I) são induzidas pela D-glicose e não estão em seus níveis máximos no princípio da fermentação alcoólica. Em conseqüência, alguns compostos além do etanol são formados no começo da fermentação (glicerol, piruvato, succinato e outros ácidos orgânicos). A síntese dos elementos carbonados (aminoácidos e açúcares) necessários na formação de biomassa se dá a partir do metabolismo das hexoses e não conduz à formação de etanol (NELSON & COX (2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer uma metodologia de hidrólise da fécula de mandioca utilizando α-amilase e glicoamilase recombinantes para obtenção de etanol combustível pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a concentração das enzimas (α-amilase e glucoamilase) para a hidrólise da fécula de mandioca;

- Hidrolisar o amido da fécula de mandioca com enzimas amilolíticas recombinantes: α-amilase e glucoamilase;

- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado com diferentes tamanhos de inóculos em fermentômetros para obtenção de álcool; utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As enzimas recombinantes (α-amilase e glucoamilase) utilizadas neste trabalho para hidrolisar a fécula de mandioca foram obtidas em trabalhos anteriormente desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa, por OLIVEIRA (2009) e CARMO (2010). Sendo que CARMO (2010) avaliou o sistema de expressão heteróloga utilizando a levedura P. *pastoris* para a produção da enzima glucoamilase, onde o cDNA da glucoamilase isolado do fungo Aspergillus *awamori* 2B 361 U2/1 foi inserido no genoma de P. *pastoris* utilizando o vetor de expressão pPIC9, baseado no promotor AOX, gerando clones recombinantes de fenótipos Mut+ e MutS cultivados sob agitação constante para a produção e secreção da proteína, os dois clones secretaram glicoamilases com 116 kDa que apresentaram diferentes poder catalítico, porém mostraram-se bioquimicamente semelhantes, apresentando mesma temperatura de atividade ótima a 60ºC, elevada ação catalítica em pH ácido de 4.5 e suas estabilidades frente ao pH do meio de reacional, possuindo portanto, características desejáveis para uso em alguns processos bioindustriais. Enquanto OLIVEIRA (2009) clonou e expressou o gene que codifica α-amilase de B. *licheniformis* em B. *subtilis* a mesma foi caracterizada em seus parâmetros bioquímicos que apresentou pH e temperatura ótimas nos valores de 7,00 e 90 ºC respectivamente e peso molecular de 58 kDa.

4.1 Concentração das amilases recombinantes

Os extratos enzimáticos produzidos foram concentrados em evaporador rotativo, observando a temperatura peculiar a cada enzima, sendo utilizado um terço do volume útil do balão. Após o processo, o concentrado foi dialisado em sacos, de celulose regenerada, com *Cut-off* de peso molecular de 16 KDa e porosidade de 25 Angstrons; em tampão TRIS-HCl numa concentração de 50 mM e, pH 7,0 e 4,5, para α-amilase e glucoamilase, respectivamente, sob agitação de 150 rpm a 37 ºC por 24 horas. E as amostras dialisadas foram dosadas pelos métodos FUWA (1954) e DNS (1959), descritos no item 4.2, para quantificação das unidades existentes após o processo de concentração.

4.2 Dosagens das atividades amilolíticas

4.2.1 Atividade dextrinizante da α-amilase

A determinação quantitativa da atividade dextrinizante da α-amilase foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Fuwa (1954). O substrato para a reação enzimática foi preparado pela dissolução por fervura de 1 g de amido solúvel (Merck) em 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 7,0 seguido de resfriamento até 40°C. O reagente Fuwa foi confeccionado pela adição das soluções KI a 10% (m/v), I_2 a 1% (m/v) e de água destilada nas proporções: 1:1:3 (v/v/v). O ensaio realizou-se como descrito: adicionou-se 60 µL do complexo enzimático a 140 µL da solução de amido solúvel a 1%, posteriormente a mistura enzima substrato foi incubada por 20 min a 90°C. Interrompendo a reação com a adição de 200 µL de ácido acético 1 M. Para a quantificação da atividade da enzima na reação, adicionou-se 200 µL do reagente de Fuwa e 9,4 mL de água destilada. Homogeneizou-se o sistema por inversão e mediu-se a degradação do amido pela diminuição da absorvância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 660 nm. O branco da reação foi preparado com 200 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 7,0, 200 µL de ácido acético 1 M, 200 µL do reagente de Fuwa e 9,4 mL de água. Todos os experimento foram realizado em triplicata.

Uma unidade de α-amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto a 90°C, partindo de 1,0 mg de amido presentes no início da reação. Utilizou-se soluções de amido em concentrações variadas de 0 a 10 mg/mL para a obtenção da curva padrão de degradação do substrato referente a dosagem de α-amilase.

4.2.2 Atividade amiloglicosidásica

A determinação quantitativa da atividade sacarificante da glicoamilase foi realizada após a obtenção dos sobrenadantes da fase de indução utilizando o método DNS descrito por Miller (1959). Este reagente é composto por ácido 3,5 dinitro-salicílico, sal de Rochelle, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio. O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração escura. Foi adicionado a 60 µL dos sobrenadantes da

enzima, 140 µL de solução de amido solúvel 1,0% (Merck) confeccionado com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, seguido de incubação a 60°C por 30 minutos, posteriormente, foi adicionado 1500 µL do reagente DNS, para que a reação fosse interrompida. A mistura foi levada a banho fervente por 5 minutos proporcionando a formação de coloração, em seguida foi rapidamente resfriada em banho de gelo e o volume completado para 10,0 mL com água destilada. Com material homogeneizado fez-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O branco para a reação foi feito com a adição de 200 µL de solução de amido solúvel 1,0% (Merck) confeccionado com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 1500 µL do reagente DNS e 8,3 mL de água destilada. Todos os experimentos foram realizando em triplicata.

Os valores das absorbâncias foram utilizados para medir a atividade da enzima nos ensaios. A curva padrão para o cálculo enzimático utilizou concentrações de glicose que variaram de 0,1 a 5,0 mg/mL.

Uma unidade de atividade sacarificante de glicoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 µmol de glicose por minuto.

4.2.3 Quantificação de glicose pelo método glicose oxidase

Em tubos de ensaio, adicionou-se 10 µL de amostra, 1 mL de reagente enzimático de glicose oxidase (GOD) a solução foi levada a aquecimento em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Resfriou-se e adicionou-se 1 mL de água. O sistema foi homogeneizado e realizou-se a leitura em espectrofotômetro num comprimento de onda de 505 nm. O preparo da amostra padrão e do branco foram feitas nas mesmas condições, substituindo a amostra pelo padrão e água destilada, respectivamente. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. A concentração de glicose presente na amostra foi calculada como descrito abaixo:

$$Glicose(g/L) = \frac{AbsorvânciaAmostra}{AbsorvânciaPadrão} \times diluição$$

4.3 Quantificação do Teor de Amido na Fécula de Mandioca

O teor de amido na fécula de mandioca foi determinado através da quantificação de glicose liberada na hidrólise enzimática, utilizando α-amilase (Thermamyl) e glucoamilase (AMG 300) comercial da NOVOZYMES. Secou-se a fécula de mandioca e ressuspendeu-a em água a fim de se obter uma concentração final de 2,0% (m/v). Ajustado o pH para 6,0 com adição de NaOH 2 M e adicionou-se uma carga de α-amilase de 1 mL/g de fécula. Aqueceu-se a mistura a 90°C durante 2 h. Decorrido o tempo reacional, a temperatura do sistema foi reduzida para 60°C e o pH ajustado para 4,5 com H_2SO_4 7,5% (v/v). Acrescentou-se uma carga de glucoamilase de 1 mL/g de fécula e manteu-se a temperatura por 24 h. Quantificou-se a glicose presente no sobrenadante pelo método enzimático de glicose oxidase (GOD). Foi realizado paralelamente duas determinações nas mesmas condições descritas acima a fim de se quantificar a glicose livre presente na mistura água-amido sem adição de enzimas (branco) e a glicose presente nos preparados enzimáticos (controle). A concentração de glicose tanto no branco como no controle, foram subtraídas da amostra hidrolisada para que estes não interfiram nos cálculos para quantificação do teor de amido presente na fécula de mandioca. O teor de amido foi calculado como descrito abaixo:

$$Amidopesoseco\ ^{(\%)} = \frac{(GT - GR)\times V \times 100}{MSG \times 1{,}11^{t}}$$

Onde,

GT: concentração de glicose total ($g.L^{-1}$);

GR: concentração de glicose residual (branco e controles) ($g.L^{-1}$);

V_T: volume total (L);

MSG: massa seca de fécula (g).

O fator de conversão 1,11 está relacionado à incorparação de uma molécula de água (18 g/mol) para liberação de uma molécula de glicose (180 g/mol), para cada ligação covalente rompida durante a hidrólise do amido (BARCELOS, 2010).

4.4 Estudo da Hidrólise Enzimática da Fécula de Mandioca

Para a avaliação e otimização das condições de hidrólise do amido da fécula de mandioca utilizou-se Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) com dois fatores (variáveis), três pontos centrais de acordo com a Tabela 4 onde as combinações geradas foram usadas tanto para as amilases comerciais quanto para as recombinantes produzidas por OLIVEIRA (2009) e CARMO (2010).

Adotou-se cargas enzimática limites de mínimo e máximo de 0 e 100 μL/g, respectivamente. Sendo glicose (g/L) a variável de resposta. A hidrólise foi realizada em tubos de ensaio nas seguintes condições reacionais: relação sólido/líquido (S/L) de 1/5 g/mL; temperatura de hidrólise com α-amilase e glucoamilase, de 90 e 60°C, respectivamente e tempo de hidrólise de 30 minutos para cada enzima, os tubos eram agitados periodicamente. Decorrido o tempo reacional, centrifugou-se as amostras em centrífuga refrigerada em 4 ºC com rotação de 4000 rpm por 45 minutos e, quantificou-se a glicose pelo método de glicose oxidase (GOD).

Tabela 4: Matriz do Planejamento(fatorial 2^3) para as cargas enzimáticas na hidrólise do amido de fécula de mandioca para condição ideal de hidrólise geradas pelo DCCR.

Experimentos	**Enzimas μL/g**	
	α-amilase	**Glucoamilase**
1	15	15
2	85	15
3	15	85
4	85	85
5	0	50
6	100	50
7	50	0
8	50	100
9 (C)	50	50
10 (C)	50	50
11 (C)	50	50

Um fluxograma do processo da hidrólise enzimática pode ser observado na figura 7.

Para cálculo da eficiência de hidrólise utilizou-se a equação abaixo:

$$EH\ (\%) = \frac{ARL}{ARO \times 1{,}11} \times 100$$

Onde,

E.H.: Eficiência da hidrólise enzimática dos grãos de fécula de mandioca (%);

ARL: concentração de açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática de fécula de mandioca ($g.L^{-1}$);

ARO: concentração de açúcares redutores que poderiam ser obtidos de fécula de mandioca com eficiência de 100% ($g.L^{-1}$).

O fator de conversão 1,11 está relacionado à adição de uma molécula de água (18 $g.mol^{-1}$) para a liberação de uma molécula de glicose (180 g. mol^{-1}), após o rompimento de cada ligação covalente durante a hidrólise do amido.

Após selecionar a condição ideal que empregou a menor carga enzimática e se obteve a maior concentração de glicose, levou-se em conta a normalização das atividades enzimáticas, comparando o desempenho entre as enzimas comerciais e as preparadas, tendo como variáveis das respostas a concentração de glicose e eficiência de hidrólise.

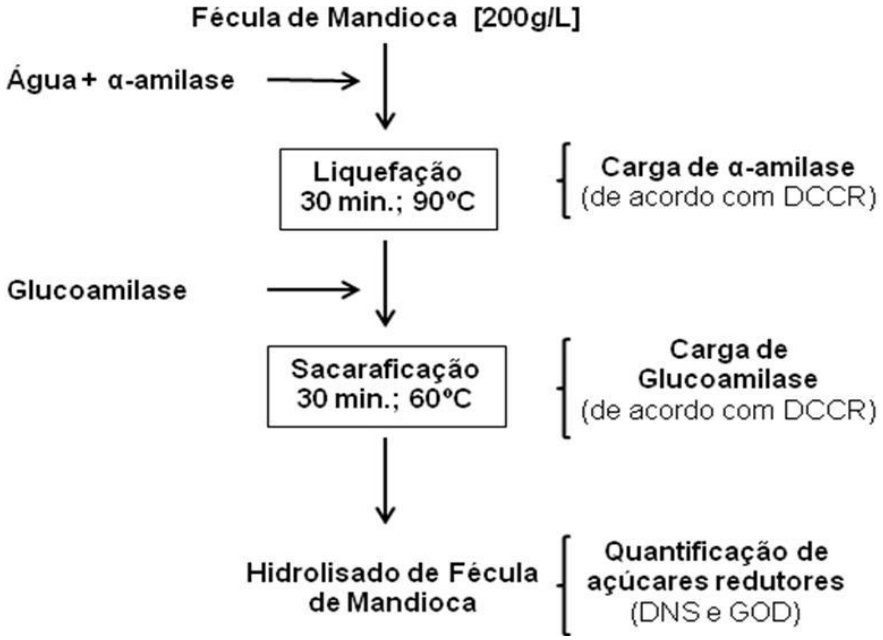


Figura 7: Fluxograma representativo do processo de estudo da hidrólise enzimática da fécula de mandioca.

4.4.1. Hidrólise de Fécula de Mandioca

Com a condição de hidrólise enzimática determinada na etapa anterior, foi realizada a hidrólise de 1.200 mL da fécula de mandioca, numa concentração de sólidos de 200 g/L. Foi adicionado o volume das enzimas recombinantes nas concentrações de 1.152 U e 4.896 U de α-amilase e glucoamilase, respectivamente, por grama de fécula. Após a adição da enzima dextrinizante a mistura foi incubada por um período de 1 hora a uma temperatura de 90 °C.

Após a liquefação com aquela enzima, o sistema passou por um processo refrigerante para que a temperatura baixasse e houvesse estabilidade de temperatura no valor de 60 °C, o pH da mistura foi aferido e passou por ajuste com H_2SO_4 1 M até que o mesmo atingisse a marca de 4,5.

Realizados todos os ajustes, adicionou-se o volume citado acima de glucoamilase, para a sacarificação e assim o sistema foi submetido novamente à incubação por um período de 3 horas a uma temperatura de 60 °C. Após a sacarificação uma alíquota de 1 mL foi coletada para quantificação da concentração de glicose, no meio fermentativo, pelo método GOD.

Durante o preparo do hidrolisado, alíquotas foram coletadas das amostras de 10 em 10 minutos para determinar os açúcares redutores e glicose pelo método DNS e GOD, respectivamente, para a construção do perfil cinético da hidrólise enzimática. O meio sacarificado foi autoclavado por 30 minutos numa pressão de 1,0 atm.

O meio fermentativo para *Saccharomyces cerevisiae* é composto de: 1,25 g/L de uréia, 1,1 g/L KH_2PO_4 , 2,00 g/L de extrato de levedura, e 40,00 mL/L da solução de sais minerais e ácido cítrico. Sendo a composição da solução de sais: 12,5 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 1,25 g/L de $CaCl_2.2H_2O$, 12,5 g/L Ácido cítrico, 0,9 g/L $FeSO_4.7H_2O$, 0,19 g/L de $MnSO_4$, 0,3 g/L de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,025 g/L de $CuSO_4.5H_2O$, 0,025 g/L de $CoCl_2.6H_2O$, 0,035 g/L de $NaMoO_4.2H_2O$, 0,05 g/L de H_3BO_3, 0,009 g/L de KI e 0,0125 g/L de $Al_2(SO_4)_3$.

4.5 Fermentação do hidrolisado de fécula de mandioca pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentômetros

Este experimento foi realizado em frascos cônicos compondo sistemas fechados com aparelhos construídos em vidro que facilita a saída do CO_2 sem permitir que haja entrada de ar, chamados de fermentômetros. A realização do processo em fermentômetros possibilitou acompanhar a fermentação pela perda de peso do sistema. A dita perda de peso é decorrente do desprendimento de CO_2, controlada por um dispositivo que, por diferença de pressão e uma coluna de água, direciona a passagem do CO_2 e minimiza as perdas por evaporação ou por arraste do gás desprendido durante o processo. O monitoramento do CO_2 com o uso de fermentômetro permitem estimar, de forma indireta, a concentração de etanol que foi formado no sistema, considerando o balanço estequiométrico da conversão de glicose a etanol.

Além da evolução de CO_2, o desempenho da fermentação foi avaliado pelas medidas iniciais e finais das concentrações de substrato e de produto, de forma a possibilitar o cálculo das principais variáveis de resposta processo ($Y_{P/S}$ e Q_P). Para a realização dos experimentos foi preparado uma quantidade de hidrolisado suficiente para o número de ensaios propostos nas condições selecionadas na hidrólise enzimática do material amiláceo (item 4.4.1).

Após a autoclavagem do hidrolisado, o sistema foi resfriado para a temperatura de até 30 ºC e retirado uma alíquota para quantificação dos açúcares redutores e glicose e só então foi inoculada a biomassa de *S. cerevisiae* comercial *Saf-instant* em três concentrações diferentes de inóculo sendo, 4 g/L, 10 g/L e 20 g/L. Após todos os parâmetros observados e aferidos foi acoplado o fermentômetro. Os frascos foram pesados com o sistema montado e, logo após a adição da levedura os mesmos foram imediatamente pesados e incubados em agitador rotatório à temperatura de 37 °C e 150 rpm.

Em intervalos definidos (inicialmente 30 minutos) monitorou-se a massa do sistema. Quando a diferença de massa entre uma medida e outra tormaram-se desprezíveis, as fermentações foram consideradas encerradas. Ao término do processo, as amostras foram retiradas para determinação de condições finais (concentração de açúcares e etanol). A quantificação de etanol foi realizada por sistema HPLC.

Para os cálculos de produtividade (Q_P), eficiência de fermentação (E.F.), fator de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$) e redução percentual de substrato (RPS), foram aplicadas as seguintes equações:

a) Produtividade Volumétrica(Q_P):

$$Q_p = \frac{(P - P_0)}{t_F}$$

Onde,

Q_P: produtividade volumétrica em etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$);

P: concentração final de etanol ($g.L^{-1}$);

P_0: concentração inicial de etanol ($g.L^{-1}$); t_f: tempo de fermentação (h).

b) Eficiência de Fermentação (*E.F.*):

$$EF(\%) = \frac{Y_{P/S}}{ET} \times 100$$

Onde,

E.F.: eficiência de fermentação (%);

$Y_{P/S}$: concentração final de etanol ($g.L^{-1}$);

ET: concentração de etanol teórico, considerando eficiência de 100% ($g.L^{-1}$).

c) Fator de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$):

$$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)}$$

Onde,

$Y_{P/S}$: fator de rendimento de produção de etanol ($g.g^{-1}$);

P: concentração final de etanol ($g.L^{-1}$);

P_0: concentração inicial de etanol ($g.L^{-1}$);

S_0: concentração inicial de glicose ($g.L^{-1}$);

S: concentração final de glicose ($g.L^{-1}$).

d) Redução percentual de substrato (*RPS*):

$$RPS(\%) = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \times 100$$

Onde,

RPS: redução percentual de substrato (%);

S_0: concentração inicial de glicose ($g.L^{-1}$);

S: concentração final de glicose ($g.L^{-1}$).

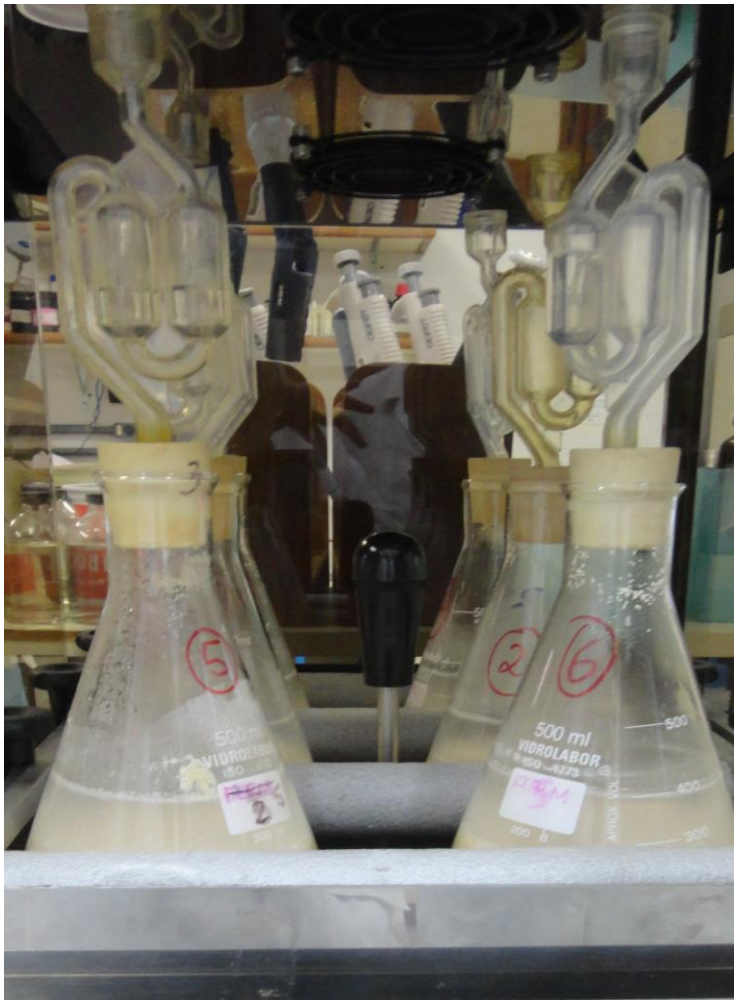


Figura 8. Fermentômetro – fermentação da fécula de mandioca.

4.6. Determinação do Teor de Etanol

4.6.1 Destilação das amostras

O mosto fermentado foi fracionado em alíquotas de 10 mL e adicionado 0,5 mL de NaOH 1M a cada amostra, após a colocação da amostra no microdestilador, foi adicionado 10 mL de água destilada. Destilou-se a mistura e recolheu-se os primeiros 10 mL do destilado.

4.6.2 Análise do álcool

As amostras coletadas durante a fermentação foi submetida a análise na Central Analítica do Laboratorio de Desenvolvimento de Bioprocessos – LADEBIO, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Para a análise do álcool foi utilizado o sistema de HPLC, com detector Waters 2414 (RID), bomba isocrática Waters 510, Autosampler: Waters 717 plus, coluna Aminex HPX 87p, a temperatura do detector foi fixada em 40 °C, tendo a coluna uma temperatura de 80 °C, e volume de injeção foi de 20 µL, o fluxo da água mili-Q, que foi usada como fase móvel, foi de 0,6 mL/min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração dos extratos enzimáticos das amilases recombinantes

Para a produção de álcool a partir de material amiláceo, os extratos enzimáticos da enzimas recombinantes produzidas por OLIVEIRA (2009) e CARMO (2010) passaram pelo processo de concentração gerando um produto enzimático para aplicação na hidrólise da fécula de mandioca.

5.1.1 Concentração das amilases recombinantes

Após a concentração por rotaevaporação o complexo amilásico dextrinizante apresentou atividade cinco vezes maior que a inicial passando de 6 U/mL para 32 U/mL. Em todas as amostras do referido extrato que foram concentradas por rotaevaporação, foram adicionadas substâncias estabilizadoras como: CaCl 1 M, polietilenoglicol (PEG) 1% e glicerol 0,75%, para que a atividade da mesma fosse mantida. Assim como o complexo amilásico, o complexo glucoamilásico também passou por concentração sendo alterada a temperatura do processo de rotaevaporação o qual foi de 60 ºC e a essas amostras foi adicionado apenas o polietilenoglicol na mesma concentração acima citado, o que resultou num aumento de atividade em dezesseis vezes partindo de 4,1 U/mL para 68 U/mL. Algumas alterações no meio como temperatura, pH, força iônica podem interferir e modificar a estrutura da proteína, alterando a organização das moléculas de água da camada de solvatação, fazendo que a mesma apresente-se na forma desnaturada e, tanto o PEG quanto o glicerol modificam a camada de solvatação, fazendo com que parte das moléculas de água sejam substituídas pelas substâncias citadas, que apresentam característica hidrofílica, o que leva a uma reorganização das moléculas de água proporcionando um aumento no número de interações intramoleculares por ligações do tipo ponte de hidrogênio auxiliando a estabilidade da molécula protéica (YAMANE et al., 1990; IYER & ANANTHANARAYAN, 2008).

Durante a realização deste trabalho outras técnicas de concentração foram utilizadas. Vários agentes precipitantes estão disponíveis, incluindo sais, calor, pH e solventes orgânicos. A solubilidade da proteína é devida, em grande parte, a distribuição

de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da molécula e, desta maneira, proteínas de diferentes componentes de uma mistura, ao responderem de modo distinto a agentes precipitantes, podem ser separadas (NOVONORDISK, 1995).

Um dos métodos de purificação utilizado foi a precipitação de proteínas com sulfato de amônia, que é conhecida por ser útil na concentração de soluções diluídas de proteína e no fracionamento de mistura de proteínas. O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da forca iônica do sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas a solução contendo proteínas, ocorre uma interação inter-proteínas, aumenta a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada forca iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. O sulfato de amônia tem sido o sal mais comumente utilizado nos ensaios de precipitação de proteína por algumas de suas características como a alta solubilidade, baixo custo e baixa toxidade (BACILA, 2001). No entanto, observou-se que as amilases recombinantes utilizadas no presente trabalho apresentaram perda significativa de atividade o que tornou a metodologia inviável.

Solventes orgânicos possuem constantes dielétricas menores que solventes inorgânicos. Por isso, a força de interação entre as enzimas e o solvente deve ser maior devido a constante dielétrica do solvente ser baixa. A adição de solventes orgânicos a uma solução aquosa contendo proteínas dissolvidas reduz a constante dielétrica, e, portanto, a polaridade da solução. Isto reduz o poder de solubilidade da agua em torno da proteína e melhora a interação proteína-proteína, levando a aglomeração e precipitação subsequentes. A principal desvantagem deste método e que os solventes orgânicos tendem a desnaturar proteínas de forma irreversível. No entanto, este fenômeno e dependente da temperatura, ocorrendo em temperaturas altas, portanto a precipitação deve ser realizada em temperaturas baixas (NEGI, S., 2009). A purificação consiste numa série de processos que removem contaminantes até a obtenção de um produto de elevado grau de pureza. Estes processos devem ocorrer em condições que mantenham a estabilidade da molécula a ser purificada, ou seja, devesse evitar a degradação da proteína (NOVONORDISK, 1995). Por isso, apesar do sulfato de amônia ser conhecido como o melhor agente para a purificação, a acetona mostrou-se o mais adequado para este trabalho por manter melhor a estabilidade da enzima trabalhada.

5.2 Quantificação do Teor de Amido na Fécula de Mandioca

A análise do teor de amido da fécula de mandioca foi fundamental para o estabelecimento de todas as correlações mássicas e determinação dos rendimentos de hidrólise e de fermentação. A fécula de mandioca apresentou um teor de amido igual a 90,8%. Essa quantidade de amido é essencial para a produção de bioetanol, que pode ser empregado na elaboração de biocombustíveis e até mesmo na produção de bebidas alcoólicas fermentadas ou fermento-destiladas. O amido é composto por centenas de unidades monoméricas de glicose que é a matéria-prima para produção de etanol.

A concentração de amido presente na fécula de mandioca é superior a de outras matérias-primas como bata-doce (79,9%) (LEONEL *et al.*, 1998), farinha de pupunha (60,65%) (SOUZA, 2010), sorgo (61,21%) (LOPEZ & STUMPF, 2000) e a torta da mamona (48%) MELO, 2006) ao observar os resultados dos estudos citados podemos constatar que a fécula é uma raiz eminentemente calórica e pode ser uma cultura da matriz bioenergética, por apresentar uma maior concentração de amido a mandioca industrial apresenta como opção energética a produção de álcool etílico (etanol) a partir de seu farelo, abrangendo o álcool carburante; etanol industrial e etanol para bebidas (CENBIO, 2012); (CNI & IEL, 2008).

5.3 Estudo da Hidrólise Enzimática da Fécula de Mandioca

O estudo da hidrólise enzimática da fécula de mandioca para determinação do efeito da carga enzimática de α-amilase e glucoamilase comerciais e recombinantes foram realizados, através do planejamento Central Composto Rotacional e posteriormente converteu-se os volumes utilizados das enzimas comerciais em carga enzimática para poder normalizar o planejamento para as enzimas recombinantes. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados do planejamento fatorial 2^4.

TABELA 5 Matriz do planejamento experimental e resultados da hidrólise enzimática do amido

Experimentos	Enzimas µL/g		Glicose g/L	
			Comercial	
	α-amilase	Glucoamilase	$R^2 = 0,573$	CAM/UFAM $R^2 = 0,899$
1	15	15	139,26	112,50
2	85	15	130,08	98,81
3	15	85	186,53	151,79
4	85	85	167,91	171,43
5	0	50	37,42	86,90
6	100	50	167,05	127,38
7	50	0	23,21	66,07
8	50	100	178,51	207,10
9 (C)	50	50	168,48	114,88
10 (C)	50	50	177,36	117,20
11 (C)	50	50	167,34	112,50

Apesar dos resultados demonstrarem a necessidade do uso combinado de ambas às enzimas para se obter uma eficiente hidrólise do substrato como vivenciado por Curvelo-Santana et al. (2010); através do diagrama de Pareto, apresentado nas Figuras 9 e 10, pode-se comprovar que nos dois processos de hidrólise utilizando as amilases comerciais e as recombinantes a glucoamilase apresenta relevante importância para a eficiência da hidrólise da fécula. Diante dos dados obtidos no presente experimento, para as amilases recombinantes, ficou fixado os valores em 1.152 U/mL (150 µL/g) de α-amilase e 4.896 U/mL (300 µL/g) de glucoamilase, para a hidrólise do mosto que apresentava uma concentração de 200 g/L de sólido.

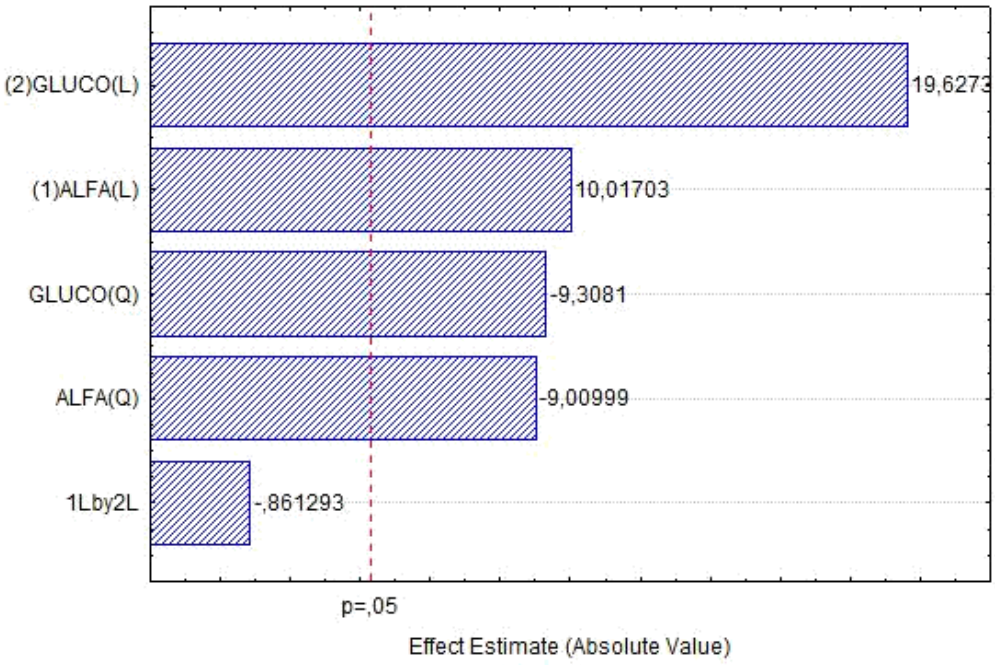


FIGURA 9: Diagrama de Pareto para hidrólise com amilases comercial.

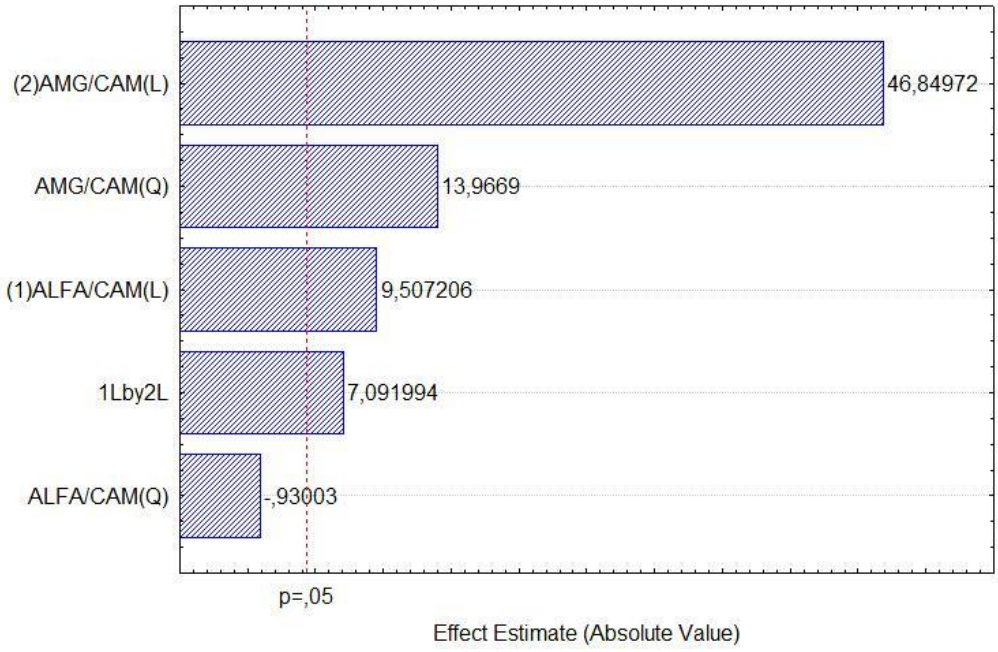


FIGURA 10: Diagrama de Pareto para hidólise com amilases recombinantes

Na figura 11-A podemos observar que a conversão do amido da fécula de mandioca ficou próxima ao seu máximo de hidrólise onde sua melhor combinação está na posição 3 - 15 µL de α-amilase e 85 µL glucoamilase - com um valor de 186 g/L de glicose quando utilizadas enzimas comerciais. Ao observar a hidrólise com amilases recombinantes a mesma aponta uma concentração de 207,1 g/L na combinação 8 – 50 µL de α-amilase e 100 µL glucoamilase - esse valor elevado de glicose pode estar relacionado a presença de outros açúcares que possam ser fermentados pela *Saccharomyces cerevisiae* como foi observado por Melo (2008) em sua pesquisa de hidrólise da mamona, porém observando-se a figura 11-B pode-se constatar que, em relação a glicose liberada, as amilases recombinantes hidrolisam a fécula, mas ainda encontra-se muito aquém do seu ótimo.

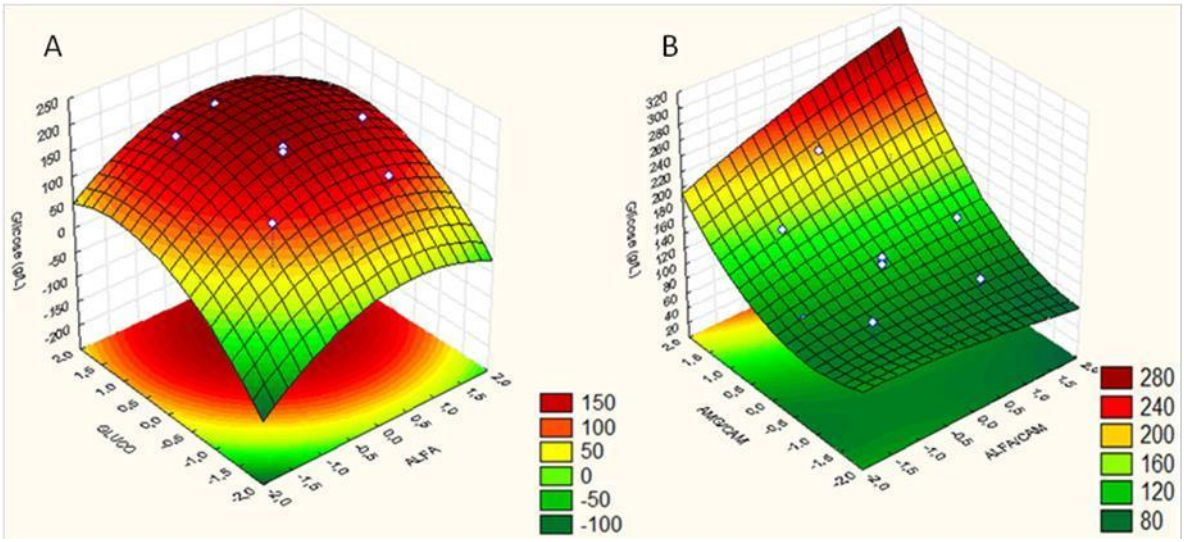


FIGURA 11: A) Superfície de resposta do estudo da carga enzimática com amilases comerciais
B) Superfície de resposta do estudo da carga enzimática com amilases recombinantes.

5.4 Hidrólise de Fécula de Mandioca

Nas figuras 12 e 13, estão apresentados os gráficos do perfil cinético da eficiência de hidrolise da fécula de mandioca pelas amilases comerciais e recombinantes sendo utilizadas as concentrações de 150 µL de α-amilase 300 µL de glucoamilase por grama de fécula.

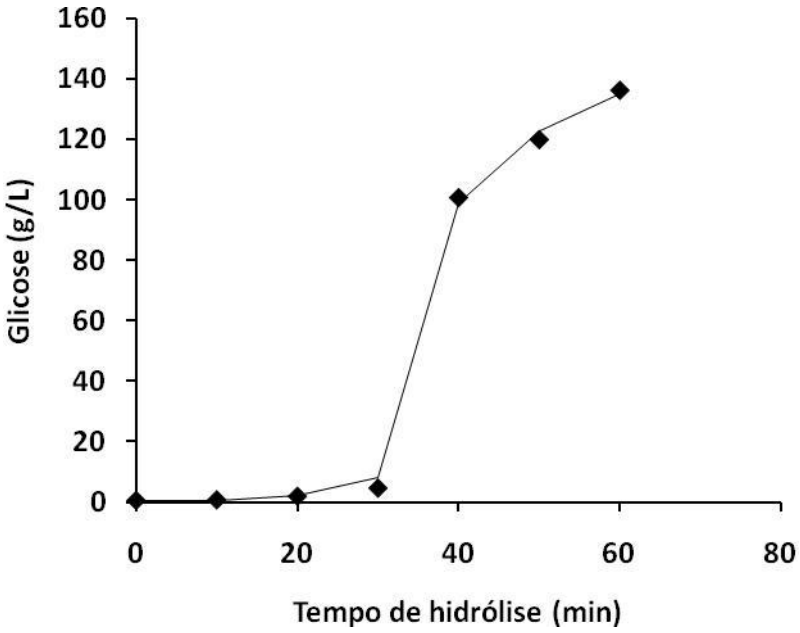


FIGURA 12: Perfil cinético da eficiência de hidrólise da fécula de mandioca utilizando amilases comerciais

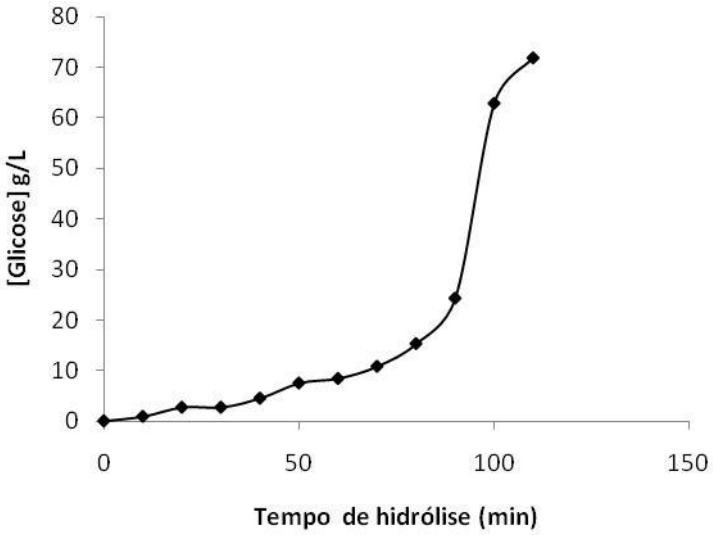


FIGURA 13: Perfil cinético da eficiência de hidrólise da fécula de mandioca utilizando amilases recombinantes

A eficiência de hidrolise é determinada pelo aumento de glicose e outros açúcares fermentescíveis no meio o que evidencia a ação das enzimas. No presente trabalho as amilases comercial liberaram 136,42 g/L de glicose o que representa uma eficiência de 63%, levando em consideração o teor de amido presente na fécula (90,8%). Silva et al. (2010), obtiveram 98% na hidrolise do amido de mandioca utilizando enzimas isoladas de micro-organismos isolados no Cerrado brasileiro porém seu período de hidrolise totalizou 24 horas, e Pacheco et al. (2011) utilizando mandioca açucarada conseguiu um marco de 167,4 g/L de glicose. As amilases recombinantes apresentaram eficiência de hidrolise de 32%. Ao final da hidrólise o mosto apresentou uma concentração final de 70 g/L de glicose para realização da fermentação utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Pode-se constatar que a hidrólise enzimática utilizando as enzimas recombinantes está no caminho correto para a conversão enzimática bem como condução de eficientes fermentações etanóicas, pois as mesmas demonstraram que realizam a clivagem das moléculas de amido de modo específico e seletivo.

5.5 Fermentação do hidrolisado de fécula de mandioca pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentômetros

A fermentabilidade dos açúcares liberados pela hidrólise utilizando as amilases recombinantes do grupo de estudo do CAM, foi avaliada nesta etapa, a Figura 14 está representado o perfil cinético da produção de etanol equivalente produzido no sistema de fermentômetro, onde o valor apresentado é estimado estequiometricamente pela liberação de CO_2.

A concentração de etanol equivalente apresentada foi de 34 g/L. Considerando que no meio estava presente 200 g/L de fécula de mandioca, com 90,8% de amido em sua composição, não esquecendo do fator de correção 1,11 está relacionado à adição de uma molécula de água (18 g/mol) para liberação de uma molécula de glicose (180 g/mol), para cada ligação covalente rompida durante a hidrólise do amido segundo BARCELOS (2010), sendo assim atinge-se uma concentração teórica de 198 g/L de glicose. Com essa concentração, o valor máximo de etanol, poderia ser de 101 g/L. O valor de etanol equivalente apontou uma eficiência de fermentação de 32%.

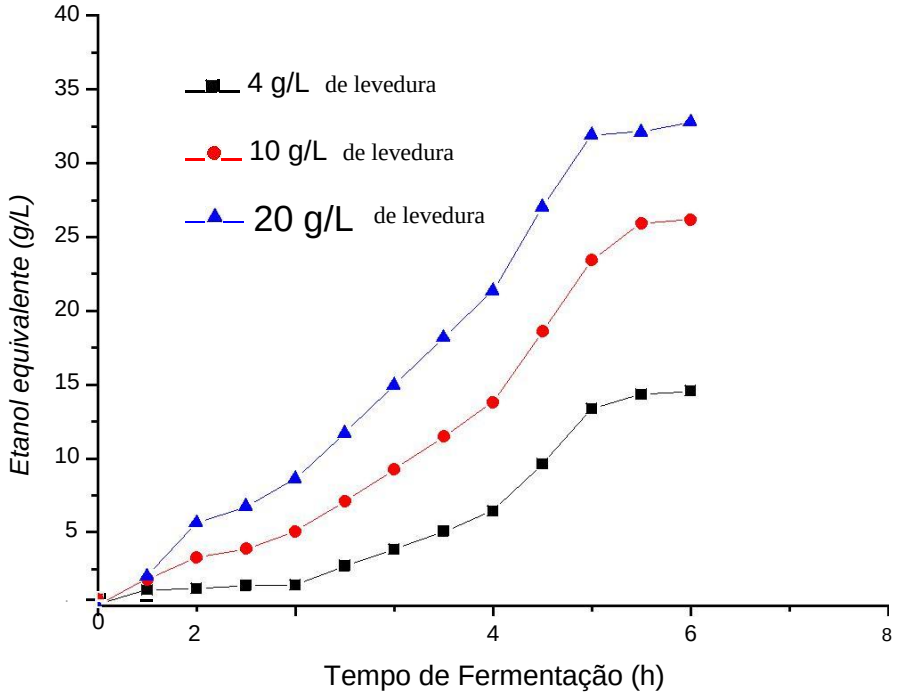


FIGURA 14: Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado das amilases recombinantes de fécula de mandioca, em fermentômetro, utilizando levedura comercial nas concentrações de 4, 10 e 20 g/L.

5.6 Análise do álcool

A fermentação conduzida com *Saccharomyces cerevisiae* comercial, teve completa conversão dos açúcares redutores após 6 h. A análise cromatográfica constatou, que o álcool produzido do hidrolisado de fécula de mandioca pelas enzimas amilolíticas recombinantes, tinha uma concentração de 20 g/L e com isso uma produtividade volumétrica (Q_P) do processo fermentativo foi igual a 3,33 gL^{-1} h^{-1}, sendo atingida uma concentração de 20 g L^{-1} ao final do processo que foi realizado em 6 horas e detectado pela análise cromatográfica, valores observados nos perfis das Figuras de 15 a 22, com essa concentração chegou-se ao equivalente a um rendimento produto substrato ($Y_{P/S}$) de 0,286 g g^{-1}. E eficiência fermentativa de 57%. Muitos são os estudos realizados em busca de novas matrizes energéticas amiláceas, porém a grande maioria ainda utiliza enzimas comerciais para a hidrólise de seus amidos.

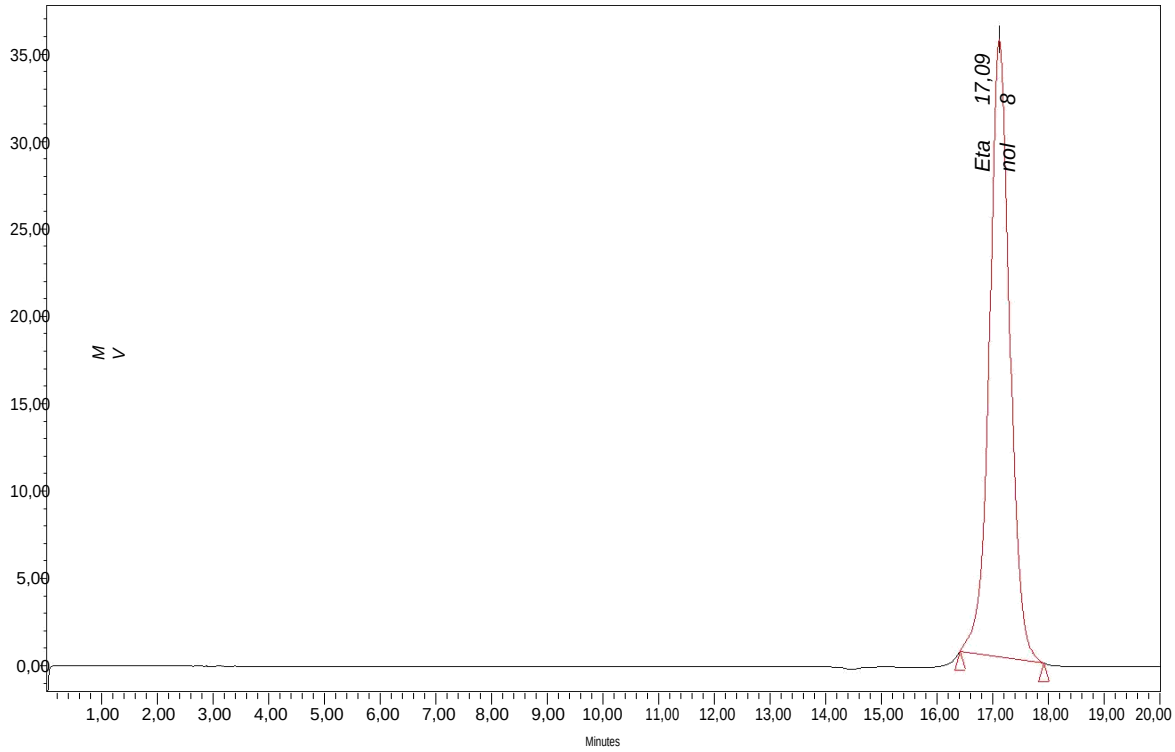


FIGURA 15: Perfil cromatográfico HPLC do etanol – padrão.e 10 g/L de etanol.

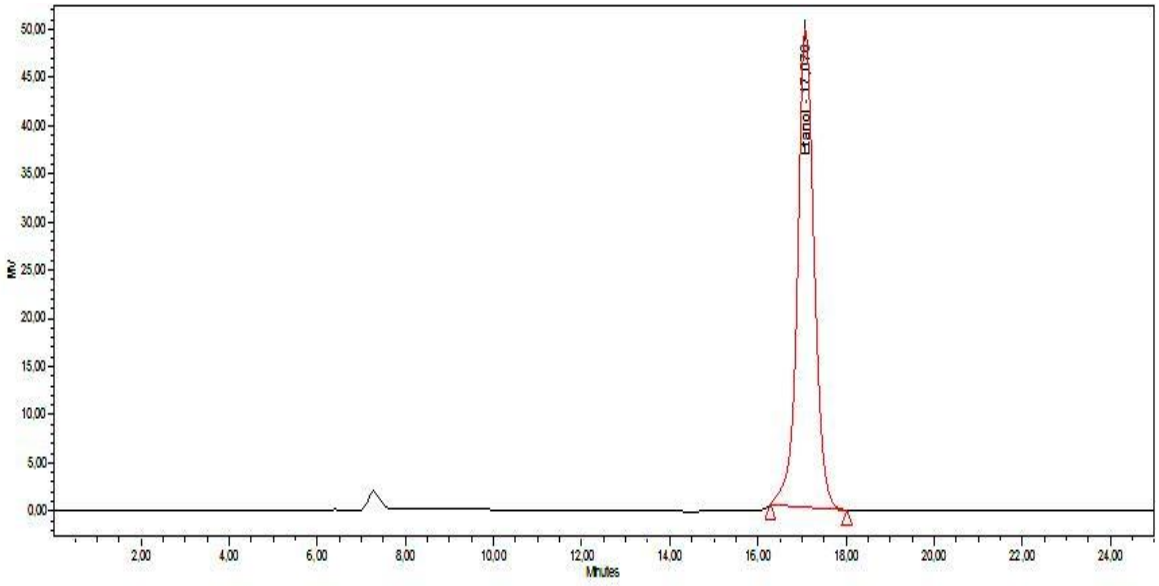


FIGURA 16: Perfil cromatográfico da amostra 1. Tendo a área média de 1306184 e quantidade de 14,81010 g/L de etanol.

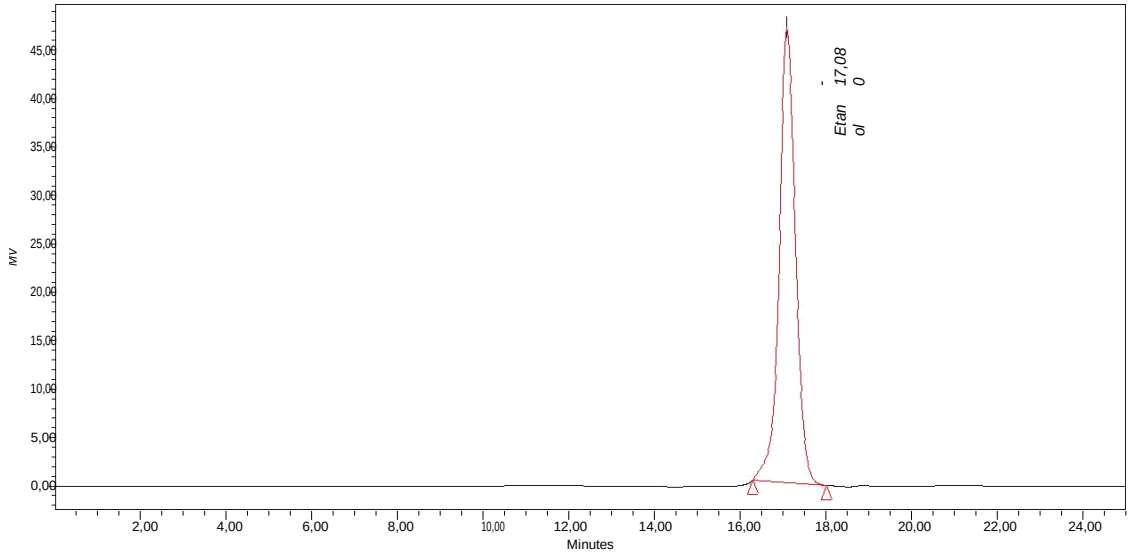


FIGURA 17: Perfil cromatográfico da amostra 2. Tendo a área média de 1235976 e quantidade de 14,01413 g/L de etanol.

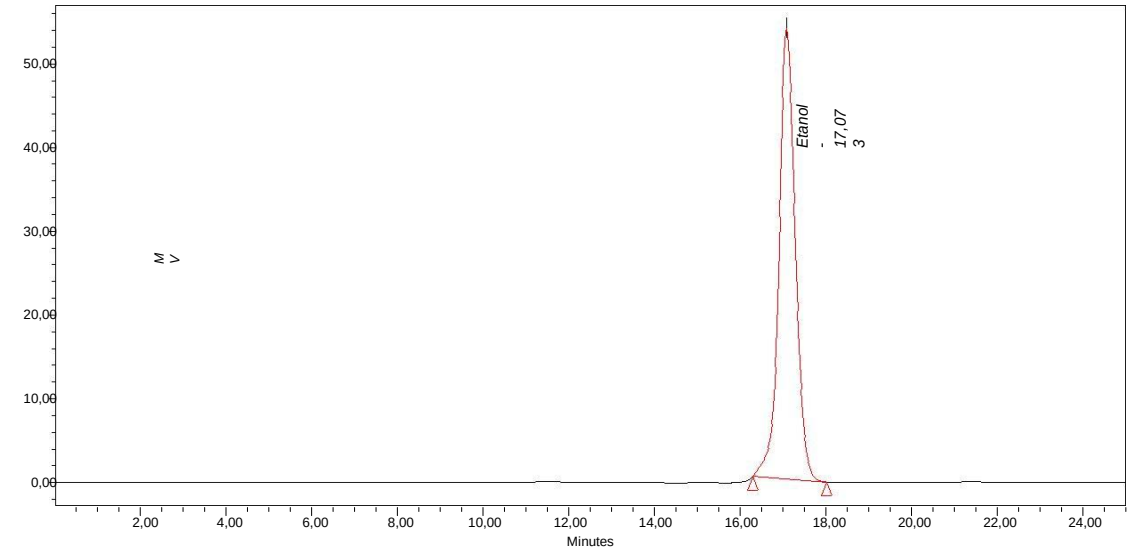


FIGURA 18: Perfil cromatográfico da amostra 3. Tendo a área média de 1422195 e quantidade de 16,12557 g/L de etanol.

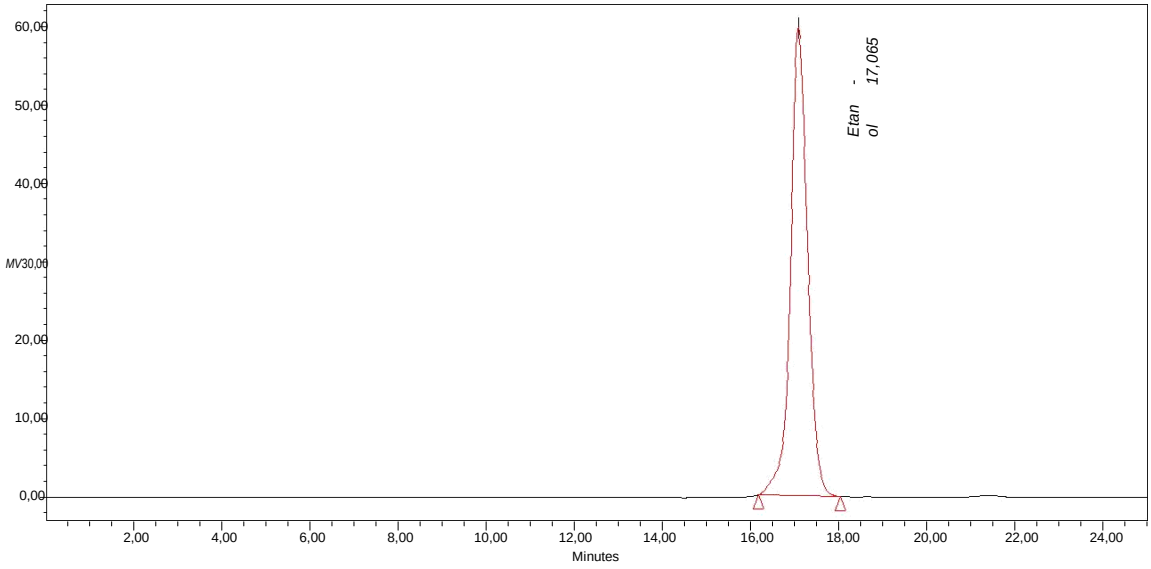


FIGURA 19: Perfil cromatográfico da amostra 4. Tendo a área média de 1599423 e quantidade de 18,13508 g/L de etanol.

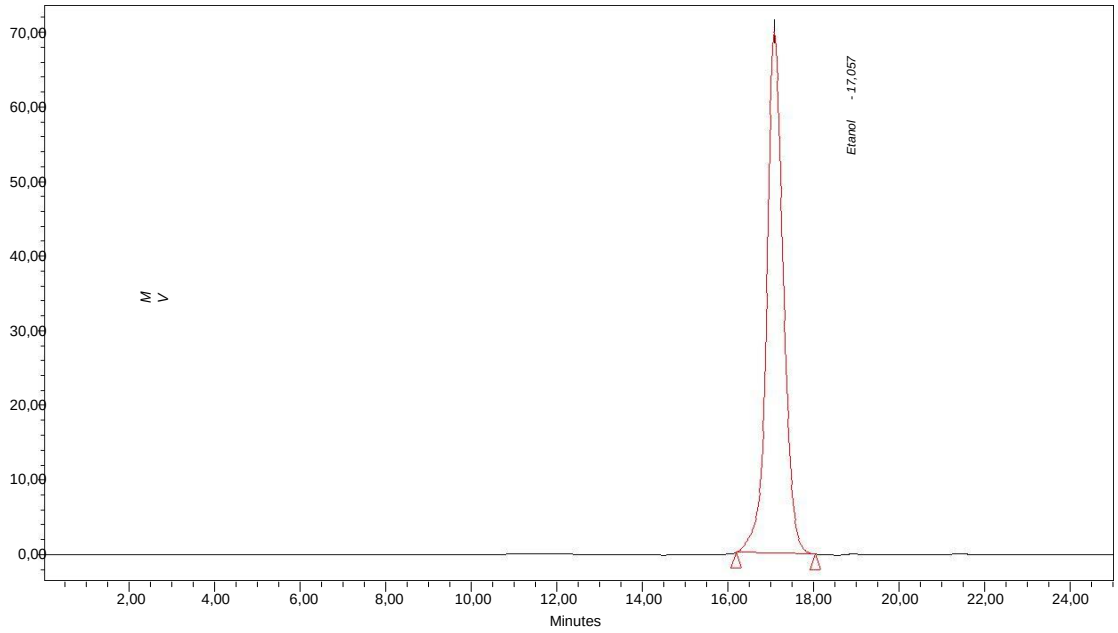


FIGURA 20: Perfil cromatográfico da amostra 5. Tendo a área média de 1883766 e quantidade de 21,3591 g/L de etanol.

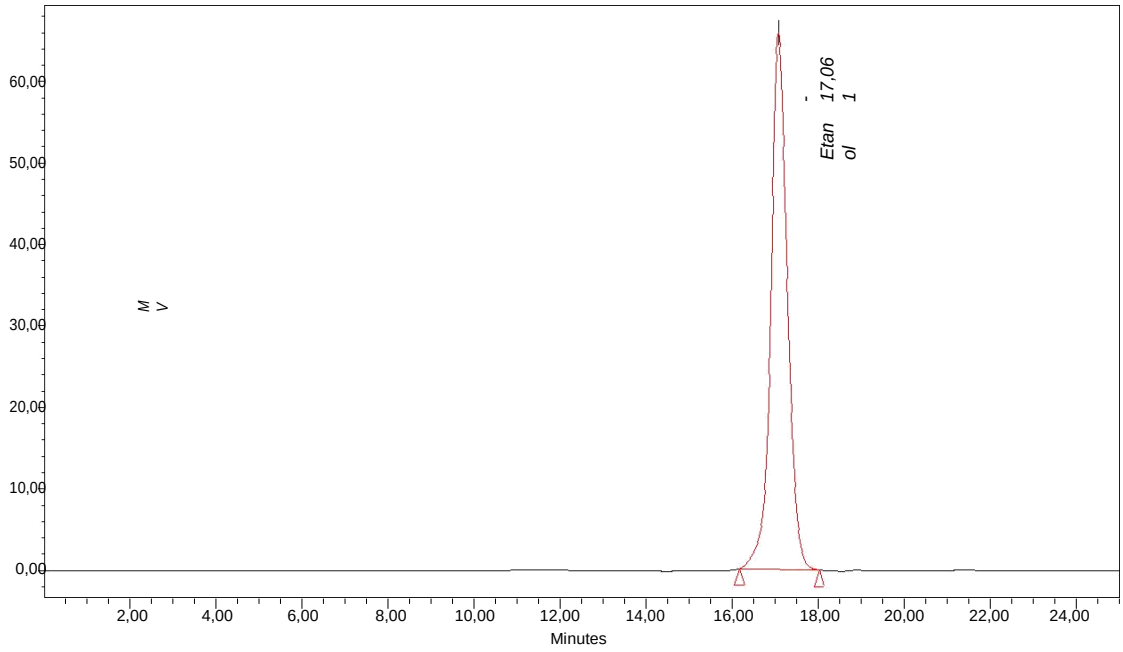


FIGURA 21: Perfil cromatográfico da amostra 5. Tendo a área média de 1767400 e quantidade de 20,03969 g/L de etanol.

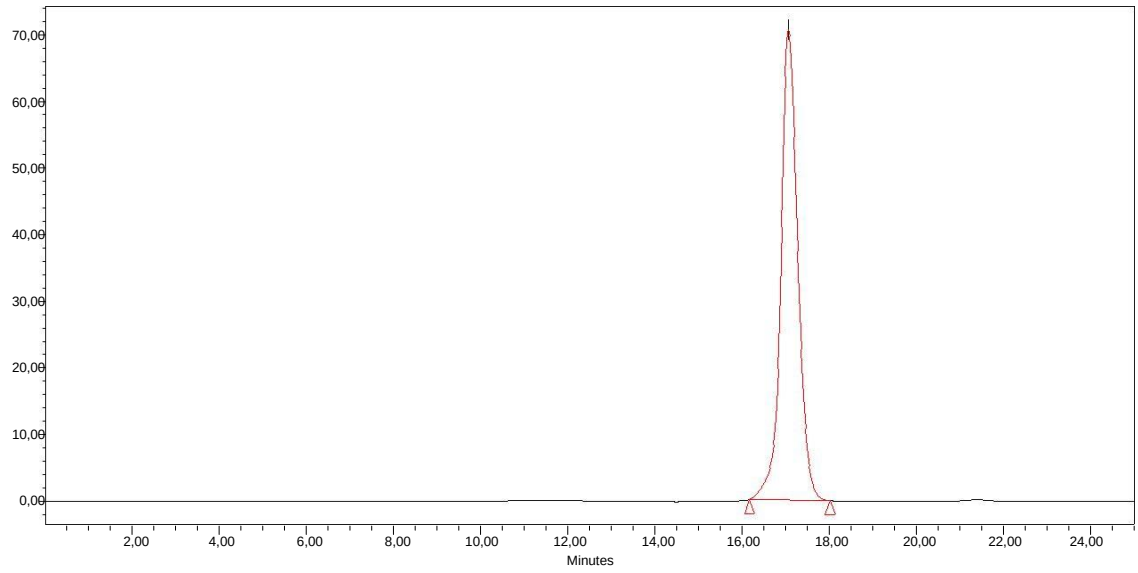


FIGURA 22: Perfil cromatográfico da amostra 6. Tendo a área média de 1904128 e quantidade de 21,58998 g/L de etanol.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi proposto estabelecer uma metodologia de hidrólise da fécula de mandioca utilizando α-amilase e glicoamilase recombinantes para posterior fermentação do hidrolisado para obtenção de etanol combustível pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As enzimas amilolíticas recombinantes de *Bacillus licheniformis* expressa em *Bacillus subtilis* (α-amilase) e *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris* (glicoamilase) são capazes de hidrolisar a fécula de mandioca para fins de produção de etanol carburante;

- A utilização de rotaevaporador rotativo mostrou-se pouco eficiente na função de concentrar o complexo amilásico pois concentrou a mesma apenas 5 vezes passando de 6 U/mL para 32 U/mL; no entanto, para o complexo glucoamilásico apresentou mais significância passando de 4,1 U/mL para 68 U/mL.

- A hidrólise enzimática utilizando as amilases recombinantes apresentou conversão de amido em glicose com 35% de eficiência levando em consideração o teor de amido presente na fécula sendo 90,80% e a concentração de sólidos no meio sendo de 200 g/L.

- A fermentação alcoólica, do hidrolisado, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* após 6 horas de processo fermentativo apresentou produtividade volumétrica Q_P de 3,33 g $L^{-1}h^{-1}$, eficiência fermentativa de 57%, fator de rendimento ($Y_{P/S}$) em substrato consumido de 0,29 gg^{-1} e obteve concentração de 20 g/L de etanol, considerado pequena quando comparada a produção de etanol de outras biomassas, vale ressaltar que a grande maioria utiliza para realização da hidrólise do amido enzimas comercias enquanto que o trabalho em questão lançou mão de enzimas recombinantes para essa função.

- As técnicas de produção e concentração das enzimas precisam ser aprimoradas para que as mesmas cheguem a uma hidrólise satisfatória com bons rendimentos;

7. PERSPECTIVAS

Os resultados desse trabalho ainda abriram as seguintes perspectivas:

- Otimizar a produção das enzimas recombinantes e produzi-las em escala de biorreator;

- Verificar novas técnicas de concentração das enzimas para que as mesmas apresentem um concentrado eficiente para hidrólise da fécula e outras biomassas amiláceas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM, 2011. Álcool de mandioca atrai investimentos. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, 13 (**www.abam.com.br**). Acesso: 26/11/2011.

ALEXANDER, R. J. Potato starch: New prospects for an old product. **Cereal Foods World**, v. 40, n. 10, p. 763-764, 1995.

AYED, A.; Rabhi, I.; Dallagi, K.; Kallel, H. 2008. High level production and purification of human interferon alfa2b in high cell density culture of *Pichia pastoris.* ***Enzyme and Microbial Technology****,* 42:173-180.

BALL, S.G., Wal, M.H.B.J. & Visser, R.G.F. 1998. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. **Trends in Plant Science** 3: 462-467.

BARCELOS, C. A. & Pereira Jr, N. **Hidrólise Enzimática de Material Amiláceo e Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado** – Apostila, disciplina Tecnologia de Bioprocesso, PPGBIOTEC/UFAM Universidade Federal do Amazonas, Ago 2010.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e mercado.** Interciência. Rio de Janeiro, Brasil. 305pp., 2008.

BUCKERIDGE, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. & Aidar, M.P.M. 2004. Mobilização de reservas. *In:* A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). **Germinação, do básico ao aplicado.** Artmed, Porto Alegre, pp. 163-185.

BUCKERIDGE, M., Santos, W.D. De Souza, A.P., As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Cortez, L.A.B. (Coord.), Edgard Blucher (Eds.), Etanol**: Pesquisa & Desenvolvimento**, in press, 2009.

CAMPOS, IVONICE – **Revista Eco 21**, Ano XIII, Ed. 80, julho 2003; disponível em www.eco21.com.br

CARMO, Edson Júnior do - Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris*, **Dissertação (mestrado)**-- INPA, Manaus: [s.n.], 2010.

CARVALHO, Sônia Maria da Silva, Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Etanol em Meio Melaço-Vinhoto empregando leveduras imobilizadas, **Tese (doutorado)** – UFAM, Manaus, 2006.

CENBIO, 2012 **Amiláseos** – disponível em: http://cenbio.iee.usp.br/saibamais/bancobiomassa/vegetaisnaolenhosos/amilaceos.htm acesso em jun/2012.

CEREDA, M.P.; FRANCO, C.M.L; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. Propriedades gerais do amido. Volume 1. *Coleção**: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas***. 2002. 221 p.

CEREDA, M. P.; Vilpoux, O. F.; Demiate, I. M. Estrutura dos grânulos de amido. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. (Ed.) ***Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas***. [S.I.]: São Paulo, Fundação Cargill, 2003b. v.1-Propriedades Gerais do Amido, cap. 6, p. 101 -133.

CEREDA, M. P.; Vilpoux, O. F.; Demiate, I. M. 2003. Amidos modificados. *In*: Cereda, M. P. Vilpoux, O. (*Eds*). ***Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas***. Vol. 3. Fundação Cargill, São Paulo, SP. p. 246-333.

CHRISTOFERSEN, C., OTZEN, D. E., NORMAN, B. E.; CHRISTENSEN, S.; SCHÄFER, T. **Enzymatic characterization of Novamyl®, a thermostable α-amylase** Starch/Stärke 50: 39-45, 1998.

COELHO, S. T. *Externalidades e custos ambientais no setor de açúcar e álcool.* Universidade Federal de Itajubá, **Curso Energia na Indústria de Açúcar e Álcool**, 12 a 16 de julho de 2004.

COSTA, J.A.V. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. **Tese de Doutorado** em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

CUNHA, S. M; GUEDES, F. F.; JUNIOR, R. W.; PALMA, M. B.(2009), **Produção de Bioetanol a partir do Bagaço de Mandioca Hidrolisado por Glucoamilase obtida por Fermentação em Estado Sólido**. XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, Natal, RN. Agosto de 2009.

CURVELO-Santana JC, Ehrhardt DD, Tambourgi EB. Otimização da produção de álcool de mandioca. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2010a; 30(3): 613-617.

DAUTER, Z., DAUTER, M., BRZOZOWSKI, A. M., **X-ray structure of Novamyl, the Five-domain "maltogenic" α-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1,7 Å resolution**. Biochemistry 38:8385-8392, 1999.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas, **Ciência Rural,** Santa Maria, RS, 2008.

DRAGUNSKI, D. C. FERRAREZI, J. G., Eletrólito sólido polimérico obtido a partir do amido de mandioca acetilado e eterificado **– 29ª Reunião anula da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, SP, 2006.

ERENO, D.; SITE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA. **Bioetanol pode ser produzido de nova variedade de mandioca doce.** 12/03/2008. [On-line]. Disponível em www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/artigo=bioetanol-pode-ser-produzido-70 de-nova-variedade-de-mandioca-doce. Arquivo capturado em 24 de agosto de 2010.

FENNEMA, O. R.; KIRK L. P.; SRINIVASAN, D, **Química de alimentos de Fennema**, Traduzido por Adriano Brandelli, Ed. ARTMED, 4ª ed. Porto Alegre, 2010.

FILHO, W.G.V; MENDES, B.P., **Fermentação alcoólica de raízes tropicais. Série: Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.** Volume 3 : Tecnologia, uso e

potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, Capítulo 19, p. 530-575. Setembro de 2003.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. ***The journal of Biochimistry***. v. 41, p. 583-603, 1954.

GANGADHARAN, D.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Bioresource Technology**, Fayetteville, n. 99, p. 4597–4602. 2008.

GUANDALINI, N.C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Disponível em: http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=383. Consultado em 03 ago. 2010.

GOLDENBERG, J.; COELHO, S. T. & LUCON, O. How adequate policies can push renewables. **Energy Policy**, v. 32, p. 1141 – 1146, 2004.

IYER PV, Ananthanarayan L (2008). Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem**., 43:1019-1032.

LEONEL, M., JACHEY, S.; CEREDA, M. P. Processamento industrial da fécula de mandioca e batata doce: um estudo de caso. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***. 18 (3): 1998.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – vol.3.** São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

LIU, S. H.; Chou, W. I.; Sheu, C. C.; Chang, M. D. – T. 2005. Improved secretory production of glucoamylase in *Pichia pastoris* by combination of genetic manipulations. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 326:817-824.

LOPES, J.; STUMPF JUNIOR, W. Influencia do grão de sorgo como fonte amido em ovinos alimentados com feno: Pareamentos plasmáticos. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, 20 (4): 1183-1199. 2000.

MELO, Walber Carvalho, Daniele Barreto da Silva e Nei Pereira Jr Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação da letalidade da torta hidrolisada para camundongos ***Quiica. Nova***, Vol. 31, No. 5, 1104-1106, 2008.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagente for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, J. R. & GOLDENBERG, J. The alcohol Program. **Energy Policy**, v. 27, n. 4, p. 229-245, 1999.

MORAES, L. P. M. Amilases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.) **Enzimas como agentes Biotecnológicos** [S.l.]: Riberão Preto, São Paulo, Legis Summa, 2004. p. 223-242.

MÜLLER, G. 2008. *Clonagem e expressão do gene da alfa-amilase de Bacillus subtilis variedade D2 na levedura Pichia pastoris.* **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 108pp.

NEGRÃO, L. C. P & URBAN, M. L. P. Álcool como "commodity" international. **Economia & Energia**, n. 47, Ano VIII, Dez 2004/Jan 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Princípio de bioquímica.** Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W. R. N. São Paulo: Ed. SARVIER, 5a ed., 839p., 2011.

NÚCLEO Central Instituto Euvaldo Lodi – **Álcool combustível** / IEL Núcleo Central – Brasilia: IEL/NC, 2008.

OLIVEIRA, Tiago Santos de, Clonagem e expressão do gene que codifica α-amilase de *Bacillus licheniformis* em *Bacillus subtilis* / **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** Manaus: UFAM — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

OSTROWSKI, A.P.; VARGAS, F.; PIZZINATTO, L.E.; HILTON, J.; ARAÚJO, B. Obtenção de álcool etílico a partir de amido de mandioca. In: Amostra de iniciação cientifíca e tecnológica interdisciplinar I, 2006. Camboriú. ***Anais da Amostra de iniciação cientifica e tecnológica interdisciplinar***. Camboriú, 2006. p. 1-21.

PACHECO, T. F.; CARVALHO, F. B. P.; POLETTO, C. M.; BELÉM, S. Produção de etanol utilizando mandioca açucarada e híbrida. XVIII **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul, 2011.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C. R., SOCCOL, V. T. SINGH, D. and MOHAN, R. **Advances in microbial amylases**. Biotechnology Applied biochem 31:135 – 152, 2000.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. New *Delhi: **Asiatech Publishers***, 1 ed., Inc, p. 760, 2005.

PARK, Y.K. ; SANTI, M.S.S. Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**. v. 55, 1977. p. 193-195.

PEREIRA Jr, N. Produção de Etanol de Biomassa: Panorama Mundial: disciplina de Bioprocesso – mestrado e doutorado – PPGBIOTEC UFAM (Universidade Federal do Amazonas), data show e impressos, Fev/2012.

PRADO, F.C. Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca. 2002, 81f. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

SALGADO, S. M.; FARO, Z. P.; GUERRA, N. B.; LIVERA, A. V. S. Aspectos físico-químicos e fisiológicos do amido resistente. **B. CEPPA**, Curitiba v. 23, n. 1, p. 109-122, jan/jun 2005.

SILVA, Ravi Gomes Vieira. Caracterização físico-química de farinha de batata-doce para produtos de panificação **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2010.

SOUZA, P.G. Elaboração de cerveja tipo lager a partir de farinha de pupunha (Bactris gasipaes Kunth) como adjunto, em bioprocessos conduzidos com leveduras livres e imobilizadas. 105 f. **Dissertação de Mestrado** (Universidade do Estado do Amazonas – UEA, mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). 2010.

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

SHUMMANN, W. Production of Recombinant Proteins in *Bacillus subtilis*. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 62, p. 137-189. 2007.

TOSTA, C. D. Biotipagem de leveduras industriais através do sistema *killer*: Piracicaba-SP, ESALQ-USP, 2004. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo) 2004.

TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J., **Enzymes in Food Processing**, 2nd edn., Blackie, New York, 1995.

SILVA, R. N.; QUINTINO, F. P.; MONTEIRO, V. N. e ASQUIERI, E. R. Production of glucose and fructose syrups from cassava (*Maninhot esculenta* Crantz) starch ussing enzymes produced by microorganisms isolated from Brasilian Cerrado soil. (2010). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** [on line]. v. 30 (1): p. 213-217, 2010.

SINNOTT, M. **Comprehensive Biological Catalysis**. **A Mechanistic Reference**, Vol. I, Academic Press, San Diego. CA., 1998.

SUMERLY, R.; Avarez, H.; Cereda, M. P.; Vilpoux, O. F. 2003. Hidrólise do amido *In*: Cereda, M. P. Vilpoux, O. (*Eds*). ***Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas***. Vol. 3. Fundação Cargill, São Paulo, SP. p. 377-448.

VICENZI, R., **Biotecnologia de Alimentos** UNIJUI – Universidade Regional do Noroeste do Estado do rio Grande do Sul. p. 51-57, 2009.

WHISTLER, R. L., J. N. BeMiller, E. F. Paschall, **Starch: Chemistry and Technology**, 2nd edn., Academic Press, New York, 1984.

WHITAKER, J. R., VORAGEN, A. G. J. and WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology** Marcel Dekker (Eds), New York, 2003.

WHITEHURST, R. J., LAW, B. A. **Enzymes in Food Technology**, 2nd edn., CRC Press, Boca Raton, FL., 2002.

WURZBURG, O. B. **modified Starches: properties and uses,** CRC Press, Boca Raton, 1986.

YAMANE, T. et al. Intramolecular esterification by lipase in microaqueous benzene: effect of moisture content. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 1063-1069, 1990.

ZIM, DÉBORA DA SILVA BRANDT, Hidrólise enzimática do amido de mandioca para a produção de bioetanol - **Dissertação mestrado** Universidade Regional de Blumenau – Blumenau 2010.