



PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA À HIDRÓLISE DO AMIDO GRANULAR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

Bernardo Alves Cinelli

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire
Leda dos Reis Castilho

Rio de Janeiro

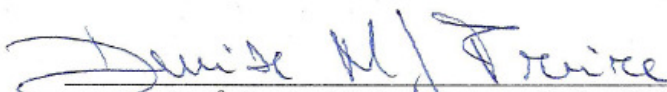
Março de 2012

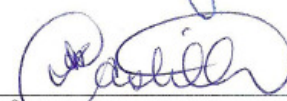
PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA À
HIDRÓLISE DO AMIDO GRANULAR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

Bernardo Alves Cinelli


DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

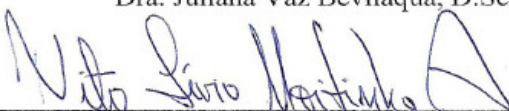
Examinada por:


Prof.^a. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.


Prof.^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.Ing.


Prof. Geraldo Lippel Sant Anna Jr., Dr.Ing.


Dra. Juliana Vaz Bevilaqua, D.Sc.


Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2012

Cinelli, Bernardo Alves

Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial/ Bernardo Alves Cinelli. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

XVII, 183 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 162-179.

1. Etanol. 2. Hidrólise do amido granular. 3. Amilases. 4. Fermentação em Estado Sólido. I. Freire, Denise Maria Guimarães *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

“Uma taxa de crescimento econômico como a da segunda metade do Breve Século XX, se mantida indefinidamente (supondo-se isso possível), deve ter conseqüências irreversíveis e catastróficas para o meio ambiente natural deste planeta, incluindo a raça humana que é parte dele. Não vai destruir o planeta, nem torná-lo inabitável, mas certamente mudará o padrão de vida na biosfera, e pode muito bem torná-la inabitável pela espécie humana, como a conhecemos, com uma base parecida a seus números atuais [...] Não sabemos para onde estamos indo. Só sabemos que a história nos trouxe até aqui”

Eric Hobsbawn

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras prof^{as}. Denise e Leda, que mais do que orientação, possuem uma incrível capacidade de transmissão do conhecimento (excelentes professoras), contribuindo assim com a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho sempre com grandes ideias. Um agradecimento especial para Aline Machado pelos ensinamentos, discussões e confiança no trabalho, que apesar de não ser orientadora formal do mestrado, acompanhou de perto todos os resultados.

A todos os meus familiares, em especial meus pais, Vanda e Umberto, e minha tia Ana, pela paciência e compreensão em meu trabalho.

À minha namorada, Nádia, pela compreensão, paciência, dedicação e apoio ao longo da condução de todo esse mestrado.

Ao prof. Reginaldo Menezes, com suas ideias e por estar sempre disposto para ajudar.

Aos companheiros da turma de mestrado 2010 do PEQ, que tiveram um papel muito importante principalmente durante o período das disciplinas.

A todos os colegas do LaBiM e LaMMP pela colaboração prestada e por propiciar um clima sempre agradável no laboratório.

Aos integrantes, ou ex-integrantes, do grupo Amilases, Daniele, Mariana, Antônia, Carol, Fábio e Olavo. Em especial para Jimmy Lopez, pelo auxílio em algumas análises e colaboração na organização dos experimentos.

Ao Pam Membranas por disponibilizar o equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura, em especial à técnica Mariana Paixão pelo auxílio na realização destas análises.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.

Aos integrantes da banca de acompanhamento de mestrado do PEQ, Prof. Tito e Dra. Cristina, pelas críticas e contribuição ao longo desta dissertação.

A todos meus professores, durante meu ensino médio no CSVP, graduação na EQ e mestrado no PEQ, que além do conhecimento, tiveram importância vital em minha formação.

A todas as demais pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para que o presente trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado durante o início deste trabalho.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, pelas bolsas durante a realização deste trabalho, pela bolsa FAPERJ aluno nota 10 concedida.

À Petrobras, pelo apoio financeiro ao projeto e por confiar no sucesso de parcerias com a Universidade.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA À
HIDRÓLISE DO AMIDO GRANULAR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

Bernardo Alves Cinelli

Março/2012

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Programa: Engenharia Química

No contexto atual de crescentes preocupações ambientais, a valorização de resíduos agroindustriais e a produção de bioprodutos a partir de fontes renováveis são temas de grande interesse. No caso da produção de etanol de fontes amiláceas, os processos convencionais apresentam elevados custos de produção associados às enzimas empregadas e à grande demanda energética para a gelatinização do amido a altas temperaturas. Como alternativa, o processo de hidrólise do amido granular torna desnecessária a gelatinização e reduz o gasto energético, apresentando vantagens econômicas. Este trabalho visa investigar o uso de resíduos da agroindústria do babaçu para produção de extrato enzimático e obtenção de etanol, através de um processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF). A produção das enzimas foi realizada por fermentação no estado sólido (FES) em torta de babaçu, e foram obtidos 110 g/L de glicose e uma eficiência de conversão de 87,0 % do amido em glicose, em um processo híbrido de hidrólise, em 72 h. O processo de SSF com extrato enzimático converteu 83,0 % do amido da farinha de babaçu em etanol, pela mesma estratégia. A maior produtividade de etanol obtida foi de 1,90 g/(L.h), com uma concentração final de 59,2 g/L de etanol. Desta forma, foi demonstrando um excelente potencial do processo de produção de etanol a partir do amido granular, com um complexo enzimático próprio produzido por FES sobre a farinha de babaçu.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

GRANULAR STARCH HYDROLYSIS OF AGRO-INDUSTRIAL RESIDUE FOR ETHANOL PRODUCTION

Bernardo Alves Cinelli

March/2012

Advisors: Denise Maria Guimarães Freire

Leda dos Reis Castilho

Department: Chemical Engineering

This work aims the development of a cold hydrolysis process using babassu residue from agro-industries for the production of amylases by solid-state fermentation and for obtaining high-sugar hydrolysates. The babassu flour residue has been used in a novel strategy as the sole raw material for the production of ethanol. The conventional processes for production of ethanol from starch sources presents elevated production costs associated with the enzymes employed and high energy demand for the steps of gelatinization, due to high temperatures. Alternatively, the process of granular starch hydrolysis makes gelatinization unnecessary and reduces the energy consumption, obtaining important economic advantages. The enzyme production (enzyme extract) was performed by solid state fermentation (SSF) in babassu cake. In a hybrid temperature hydrolysis strategy, 110 g/L glucose and a conversion efficiency of 87.0% of starch into glucose, after 72 h were obtained. The process of SSF with enzyme extract converted 83.0% of starch from babassu flour into ethanol, using the same strategy. The best result for the volumetric productivity of ethanol was 1.90 g/(L.h), while the maximum ethanol concentration produced was roughly 59.2 g/L in 48 hours. Therefore was demonstrated an excellent potential for ethanol production from granular starch with an enzyme complex on babassu flour. The results indicate appropriate conditions for the ethanol production, and probably adaptable to obtain byproducts from renewable sources.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1	A matéria-prima	8
3.1.1	Biomassa e os resíduos agroindustriais	8
3.1.2	Matérias-primas amiláceas	9
3.1.3	O babaçu	10
3.1.4	O amido	13
3.2	As enzimas envolvidas na degradação do amido	16
3.2.1	Enzimas	16
3.2.2	Amilases	17
3.2.3	Produção de amilases	25
3.3	O etanol	28
3.3.1	História	28
3.3.2	O combustível	29
3.3.3	Panorama mundial	31
3.3.4	A história do álcool no Brasil	33
3.3.5	A fermentação alcoólica	39
3.3.6	Processos convencionais de produção de etanol	44
3.3.7	Tendências futuras: Biorrefinarias	51
3.4	Produção de etanol: Processo não convencional.....	52
3.4.1	A hidrólise do amido granular – “Cold Hydrolysis”	53
3.4.2	Fundamentos da hidrólise do amido granular	53
3.4.3	Hidrólise do amido granular na produção de etanol	58

3.4.4	Estado da arte.....	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1	Matérias-primas	68
4.1.1	Teor de umidade	68
4.1.2	Caracterização físico-química	68
4.2	Microrganismos.....	69
4.3	Manutenção, propagação e composição dos meios.....	70
4.3.1	Manutenção dos microrganismos	70
4.3.2	Meios e condições de propagação	71
4.4	Determinações quantitativas e composição de soluções utilizadas	72
4.4.1	Solução tampão universal	72
4.4.2	Padrão de amido	73
4.4.3	Quantificação de glicose.....	73
4.4.4	Dosagem de Açúcares Redutores Totais (ART).....	74
4.4.5	Quantificação de amido solúvel.....	74
4.4.6	Quantificações por cromatografia líquida (HPLC)	75
4.4.7	Quantificação de FAN.....	75
4.4.8	Dosagem de proteínas.....	76
4.4.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	76
4.4.10	Atividade amilolítica	77
4.4.11	Atividade celulolítica.....	77
4.4.12	Atividade xilanolítica.....	78
4.4.13	Atividade proteolítica.....	78
4.4.14	Quantificação de levedura.....	79
4.4.15	Concentração de farinha em base seca	79

4.5	Condução dos experimentos	80
4.5.1	Produção das enzimas (fermentação em estado sólido)	80
4.5.2	Enzimas comerciais	81
4.5.3	Reações de hidrólise do amido granular	81
4.5.4	Produção de etanol	85
4.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	87
4.7	Cálculo das variáveis de resposta	88
4.7.1	Parâmetros de crescimento celular	88
4.7.2	Eficiência de hidrólise	89
4.7.3	Taxa inicial de hidrólise	89
4.7.4	Produtividade	90
4.7.5	Rendimento	90
4.7.6	Eficiência de fermentação	90
4.7.7	Eficiência do processo	91
4.7.8	Testes estatísticos	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1	Caracterização da matéria-prima	94
5.2	Caracterização do extrato enzimático: Atividade enzimática	95
5.2.1	Produção das enzimas	95
5.2.2	Reprodutibilidade do processo de FES e estabilidade das enzimas produzidas	97
5.3	A hidrólise do amido granular	99
5.3.1	Ensaio preliminares	100
5.3.2	Investigação das variáveis de hidrólise com extrato enzimático	103
5.3.3	Estudo do efeito da temperatura na hidrólise enzimática	109

5.3.4	Avaliação de estratégias de hidrólise	111
5.3.5	Desempenho de hidrólise do amido granular em 72 h	114
5.3.6	Hidrólise do amido granular de milho	122
5.4	Estudo e seleção de linhagens de levedura	124
5.4.1	Estudo com as linhagens recombinantes	125
5.4.2	Estudo com a cepa industrial de levedura	128
5.5	Avaliação de estratégias de SSF	133
5.5.1	Perfis cinéticos de resposta	135
5.5.2	Avaliação global dos estudos de SSF	147
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	155
	REFERÊNCIAS	162
	APÊNDICES	180

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Cortes do coco de babaçu: Transversal (i) e longitudinal (ii). Componentes do externo para o interno: epicarpo-a; mesocarpo-b; endocarpo-c; e amêndoa-d. Fonte: TEIXEIRA (2008).	11
Figura 3.2: Estrutura dos componentes do amido. Fonte: Adaptado de MURPHY (2000) e CASTRO <i>et al.</i> (2011a).....	14
Figura 3.3: Ação das amilases sobre estrutura do amido. Fonte: Adaptado de CASTRO <i>et al.</i> (2011a).....	20
Figura 3.4: Representação esquemática das regiões de uma glucoamilase de <i>Aspergillus niger</i> . Neste exemplo o domínio catalítico vai do aminoácido 1 ao 466 e o domínio de ligação ao amido do aminoácido 509 ao 616. Fonte: Adaptado de SAUER <i>et al.</i> (2000).....	21
Figura 3.5: O mecanismo catalítico de glucoamilase ilustrando a ação da base catalítica Glu400 (superior) e catalisador ácido Glu179 (abaixo) na hidrólise assistida da água do substrato envolvendo inversão da configuração do carbono anomérico. Fonte: SAUER <i>et al.</i> (2000).....	22
Figura 3.6: Localização das unidades de produção de etanol nos EUA. Fonte: Adaptado de RFA (2011).	32
Figura 3.7: Distribuição da produção mundial de etanol em 2009. Fonte: Adaptado de F.O. Licht <i>apud</i> RFA (2010).	33
Figura 3.8: Participação de veículos leves por tipo de combustível nas vendas internas. Fonte: Adaptado de ANFAVEA (2011).	36
Figura 3.9: Evolução da produção de etanol no Brasil. Fonte: Elaborado a partir de dados MAPA (2010) e UNICA (2011).	37
Figura 3.10: Via metabólica da fermentação de etanol em <i>S. cerevisiae</i> . Abreviações: HK: enzima hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfoglicomutase, ENO: enolase, Pyk: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, e ADH: álcool desidrogenase. Fonte: BAI <i>et al.</i> (2008).....	40
Figura 3.11: Curva típica de crescimento de levedura. Fonte: RUSSELL (2003).	43
Figura 3.12: Fluxograma simplificado de produção de etanol por via seca. Fonte: Adaptado de KWIATKOWSKI <i>et al.</i> (2006).....	48
Figura 3.13: Repartição dos custos operacionais para a produção de etanol anidro pela via seca. Fonte: Elaborado com dados de PIMENTEL e PATZEK (2005); KWIATKOWSKI <i>et al.</i> (2006); PERKIS <i>et al.</i> (2008); QUINTERO <i>et al.</i> (2008).	49
Figura 3.14: Diagrama da TOBASA para produção de etanol de farinha de babaçu: etapas de gelatinização, liquefação e sacarificação. Fonte: Adaptado de BARUQUE FILHO <i>et al.</i> (2000).	50
Figura 3.15: Modelo ilustrando as diferentes barreiras de transferência de massa potencialmente afetando a taxa de hidrólise de amido granular. Fonte: VIDAL <i>et al.</i> (2009a).....	54
Figura 3.16: Representação ilustrativa do processo convencional (via seca) e do processo de baixo consumo energético (não convencional). Em tons mais claros são mostradas as etapas do processo	

convencional que não são necessários no processo não convencional. Fonte: Adaptado de GENENCOR (2008).	61
Figura 5.1: Diagrama de potencial biorrefinaria integrada baseada na utilização do babaçu.	92
Figura 5.2: Gel de eletroforese (SDS-PAGE) do extrato enzimático. O padrão utilizado contém proteínas com massas molares de 94, 67, 43, 30, 20 e 14 kDa.	96
Figura 5.3: Teste t para os valores médios de atividades amilolíticas, calculado com nível de confiança de 95 %. Amostras de 1-6 correspondem aos extratos enzimáticos de suas respectivas fermentações.	98
Figura 5.4: Estabilidade da atividade amilolítica presente no extrato após liofilização e estocagem.	99
Figura 5.5: Perfis cinéticos de hidrólise da farinha de babaçu a 160 g/L, pH=5,0, com agitação orbital de 200 rpm. Extrato enzimático: 20 U/mL. Carga de Stargen: 1,2 g/Kg _{MP} . Controle negativo sem a presença de enzimas.	101
Figura 5.6: Resposta de hidrólise da avaliação do efeito de enzima e farinha. Experimentos 1, 2, 3 e 4 e ponto central se referem às condições do planejamento experimental. A linha pontilhada indica a mudança de temperatura.....	105
Figura 5.7: Diagrama de Pareto dos resultados do planejamento experimental de hidrólise para o tempo de 4 h.	105
Figura 5.8: Plano de resposta do planejamento experimental de hidrólise para o tempo de 4 horas.	106
Figura 5.9: Diagrama de Pareto dos resultados do planejamento experimental para a taxa inicial de hidrólise.	107
Figura 5.10: Plano de resposta do planejamento experimental para a taxa inicial de hidrólise.....	107
Figura 5.11: Investigação da região de maior produção de glicose na hidrólise em diferentes atividades enzimáticas e concentrações de farinha. A linha pontilhada indica a mudança de temperatura...108	108
Figura 5.12: Perfis cinéticos de hidrólise em diferentes temperaturas. Experimentos 30°C, 32°C, 40°C, 50°C e 60°C realizados em suas respectivas temperaturas. O controle negativo foi realizado em enzima a 60°C.	109
Figura 5.13: Perfis cinéticos de hidrólise do Estudo com diferentes estratégias e comparação com enzimas comerciais. Experimentos com extrato e Stargen com temperaturas de 40 °C e 50 °C por 6 horas, em seguida de 32°C, e extrato enzimático a 50 °C por 4 horas com restante a 32°C.....	111
Figura 5.14: Perfis cinéticos de hidrólise por 72 h com a produção de glicose (em g/L) e concentração de FAN (em mg/L). A linha pontilhada indica mudança na temperatura de 50 °C para 32 °C. A concentração de FAN foi determinada apenas para os experimentos conduzidos com o extrato enzimático.	115
Figura 5.15: Concentração de glicose em g/L e FAN em cg/L produzidos nas melhores condições do extrato enzimático e Stargen™002.	119
Figura 5.16: Perfil cromatográfico de açúcares: (a) hidrólise da farinha de babaçu após 72 h com extrato enzimático; (b) padrão de glicose.....	120

Figura 5.17: Micrografias obtidas por MEV (5000x) dos grânulos de amido da farinha de babaçu. Sendo (a) grânulos de amido nativos, sem enzima (controle); (b) após 4 h de hidrólise com extrato enzimático; (c) 24 h; (d) 48 h; e (e) 72 h.	121
Figura 5.18: Micrografias obtidas por MEV dos grânulos de amido da farinha de babaçu. Sendo (a) grânulo de amido nativo, sem enzima (controle); (b) após 4 h de hidrólise com extrato enzimático; (c) 24h; (d) 72 h.....	122
Figura 5.19: Perfis cinéticos de hidrólise de farinha de milho com o extrato enzimático, Stargen™002 e sem enzima (controle) por 72 h. A linha pontilhada indica mudança na temperatura de 50 °C para 32 °C.....	123
Figura 5.20: Perfis cinéticos de crescimento em meio amido YPS2. Cepas recombinantes alfa-amilase, glucoamilase e A2.	125
Figura 5.21: Perfis cinéticos de crescimento em meio amido YPS2. Cepa JP1 e as cepas recombinantes alfa-aglutinina e B5.	126
Figura 5.22: Fermentação em meio Amido (YPS10). Cepas recombinantes alfa-amilase, glucoamilase e A2.....	127
Figura 5.23: Fermentação em meio Amido (YPS10). Cepa JP1 e cepas recombinantes alfa-aglutinina e B5.	127
Figura 5.24: Perfil cinético de crescimento da cepa JP1 em meio YPD a 32 °C, 250 rpm. Crescimento de biomassa celular e consumo de glicose. Os experimentos de fermentação foram realizados em duplicata. As barras de erro representam uma unidade de desvio padrão.	129
Figura 5.25: Cinética de crescimento, de consumo de glicose e formação de etanol para a cepa JP1 em diferentes meios.	130
Figura 5.26: Estudos de fermentação em meio YPD cepa JP1. Condição 1: frascos com rolha vazada. Condição 2: frascos com sistema <i>air lock</i>	132
Figura 5.27: Consumo de FAN durante fermentação em meio YPD cepa JP1. Condição 1: frascos com rolha vazada. Condição 2: frascos com <i>air lock</i>	133
Figura 5.28: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia I. Cepas JP1 e A2, ou sem levedura (controle).	136
Figura 5.29: Produção e consumo de FAN ao longo do processo SSF – Estratégia I. Cepas JP1 e A2, ou sem levedura (controle).	136
Figura 5.30: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia I. Cepa JP1 com Stargen™ 002. Curva com linha tracejada: produção de etanol com extrato enzimático.	139
Figura 5.31: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia II. Cepas JP1 e A2.	140
Figura 5.32: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia III. Cepas JP1 e A2.	141
Figura 5.33: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia III com a cepa A2 sem adição de enzima.	142
Figura 5.34: Perfis cinéticos da produção de etanol de milho processo SSF através da estratégia I com a cepa JP1 e extrato enzimático.	144

Figura 5.35: Perfis cinéticos da produção de etanol de farinha de babaçu por processo SHF com a cepa JP1 e extrato enzimático.....	145
Figura 5.36: Perfis cinéticos da produção de etanol por batelada alimentada de farinha de babaçu com a cepa JP1 e extrato enzimático.	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição de matérias-primas amiláceas (% em massa seca)	10
Tabela 3.2: Composição média da farinha do mesocarpo de babaçu (processada industrialmente). Fonte: BARUQUE FILHO <i>et al.</i> (2000).....	13
Tabela 3.3: Propriedades de algumas amilases fúngicas. NR: valores não reportados.....	23
Tabela 3.4: Levantamento da literatura sobre os processos de hidrólise do amido granular. Nos casos em que mais de uma matéria-prima foi utilizada, as respostas estão designadas na mesma ordem das matérias-primas.....	65
Tabela 3.5: Levantamento da literatura sobre os processos de produção de etanol por hidrólise do amido granular, conduzidos com fermentação e sacarificação simultâneas.	67
Tabela 4.1: Composição do reagente original de DNS. Fonte: SUMNER (1921).	74
Tabela 4.2: Composição da Farinha de milho amarela (Yoki).....	85
Tabela 5.1: Composição da Farinha de babaçu.	94
Tabela 5.2: Caracterização das enzimas presentes do extrato.	97
Tabela 5.3: Dados comparativos entre Stargen™, extrato enzimático e controle ao final de 24 horas de hidrólise.	102
Tabela 5.4: Influência da enzima e da concentração de farinha na hidrólise do amido granular.....	103
Tabela 5.5: Parâmetros de resposta de hidrólise da farinha de babaçu com extrato a 30°C, 32°C, 40°C, 50°C e 60°C. Experimento controle sem extrato a 60°C.	110
Tabela 5.6: Taxa inicial de hidrólise, eficiência de hidrólise da farinha de babaçu, rendimento e produtividade de glicose obtidos após 4 h e 24 h de hidrólise para diferentes estratégias com produto comercial Stargen™ 002 e com extrato enzimático.	112
Tabela 5.7: Comparação do presente trabalho com processos da literatura. Todos os trabalhos reportam processos de hidrólise do amido granular, com exceção do trabalho de BARUQUE-FILHO <i>et al.</i> (2000), que diz respeito ao processo convencional, porém especificamente a mesma matéria-prima do presente trabalho.....	117
Tabela 5.8: Condições e respostas obtidas em experimentos variando composição dos meios de fermentação para a cepa JP1.....	130
Tabela 5.9: Respostas obtidas para as diferentes estratégias de produção de etanol. Os dados foram calculados a partir dos resultados nos tempos de fermentação de 24 h para a estratégia II e o processo com farinha de milho, e de 48 h para os demais.	148
Tabela 5.10: Comparação do presente trabalho de produção de etanol com processos da literatura envolvendo hidrólise do amido granular e com processo convencional com farinha de babaçu....	150
Tabela 5.11: Desempenho do processo SHF após 48 h de fermentação.	152

1 INTRODUÇÃO

Ao longo de todo o século XX, os produtos do refino de petróleo tornaram-se a principal forma de geração de energia e a principal base para o desenvolvimento da indústria química. Após a Segunda Guerra Mundial o uso destes derivados aumentou rapidamente e, hoje em dia, a vida sem esses produtos é difícil de imaginar. Desta forma, existe uma dependência global por esta matéria-prima fóssil que torna diversas nações extremamente susceptíveis às variações do preço do petróleo no mercado internacional. Portanto, problemas relacionados à segurança no suprimento de energia apresentam um papel relevante, uma vez que poucos países detêm grande parte da produção mundial de petróleo.

Além da instabilidade política gerada pela concentração da produção desse insumo energético, o impacto ambiental dos combustíveis fósseis tornou-se uma grande preocupação na sociedade moderna, sendo estes responsáveis por uma parcela significativa da emissão dos principais gases que contribuem para o aquecimento global. Há evidências científicas claras que as emissões de gases de efeito estufa (GEE), como dióxido de carbono, metano, SO_x e NO_x, decorrentes da queima de combustíveis fósseis entre outras atividades humanas, estão afetando o clima da Terra (IPCC, 2007).

Os problemas ambientais estão presentes nas agendas da política global e representam um enorme desafio para a humanidade, agora e no futuro. As crescentes demandas das sociedades de consumo nos países desenvolvidos e emergentes ameaçam os recursos naturais do planeta, criando uma necessidade urgente de um novo caminho de industrialização, baseado em novas tecnologias de produção e consumo, com utilização racional de recursos e baixa poluição ambiental. O antigo modelo de uso intensivo de recursos para o crescimento econômico não pode funcionar no século XXI (WORLD WATCH INSTITUTE, 2006).

Um dos maiores desafios para a sociedade deste século será atender a demanda crescente de energia para processos de aquecimento, de transporte e industriais e fornecer matéria-prima para a indústria em geral (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

Nos dias de hoje, a substituição gradual do petróleo por fontes de energia alternativas oriundas de biomassas renováveis é vista como um importante contribuinte para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e eficaz quanto aos problemas ambientais (RAGAUSKAS *et al.*, 2006). Vive-se, hoje, em uma época de mudanças, estando em curso uma verdadeira mudança de paradigma, transformando uma sociedade altamente dependente de combustíveis fósseis em uma baseada na utilização de recursos renováveis, acompanhada de um modelo econômico mais sustentável (CLARK *et al.*, 2006; HOLM-NIELSEN *et al.*, 2006).

Por todas estas questões econômicas, geopolíticas e ambientais apresentadas, as atenções do mundo se voltam para fontes alternativas de energia, em especial para os biocombustíveis, como o etanol. Os biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis (biomassa), seja esta produzida especificamente com esse propósito, nos chamados cultivos energéticos – "*Biocombustíveis de primeira geração*" – ou obtida a partir de resíduos orgânicos de algum processo, caracterizando-a biomassa residual – "*Biocombustíveis de segunda geração*". Contudo, esta classificação nem sempre é simples, e muitas vezes não é adequada, dependendo da matéria-prima e do processo utilizados, bem como de incertezas quanto aos impactos ambientais. Termos como "maior geração" ou mais "avançados", utilizados para caracterizar os biocombustíveis, sugerem superioridade. No entanto, esta superioridade, em termos de sustentabilidade, não necessariamente se verifica e precisa ser avaliada criticamente para cada tipo de biocombustível (UNEP, 2009).

O etanol como biocombustível líquido aparece como um dos mais importantes recursos alternativos aos combustíveis fósseis. No Brasil, o etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar. Hoje o Brasil é o segundo maior produtor mundial, seu custo é competitivo e foi conseguido em cerca de 30 anos decorridos desde a criação do Proálcool, programa lançado no país em meados da década de 1970 para reduzir a dependência da importação de petróleo. A tecnologia utilizada para produzir o etanol é relativamente madura e envolve a fermentação de açúcares, como sacarose e glicose, provenientes da cana-de-açúcar, geralmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nos Estados Unidos, maior produtor mundial de etanol, o principal insumo para a sua produção tem sido o amido de milho, o programa é mais recente e suas

justificativas são a substituição de aditivos promotores de octanagem na gasolina automotiva e a redução das emissões de gases do efeito estufa.

Não existem dúvidas quanto aos biocombustíveis serem renováveis, tendo em vista que sua matéria-prima pode ser replantada e pelo fato de possuírem potencial de redução das emissões de GEE. Além disso, podem fornecer segurança energética, reduzindo a dependência de petróleo estrangeiro, e ajudar o desenvolvimento em áreas rurais. Entretanto, estes efeitos benéficos dependem do tipo de biocombustível a ser produzido, da forma de condução do processo e da fonte de carboidrato a ser utilizada (TAYLOR *et al.*, 2009).

Críticas têm sido levantadas sobre os rendimentos líquidos de energia e a diminuição de GEE dos processos convencionais de produção do etanol de milho (FARRELL *et al.*, 2006). Já os processos de etanol de cana-de-açúcar são considerados de fato renováveis e sustentáveis, uma vez que o bagaço da cana é capaz de suprir toda a energia necessária para a fase industrial da produção do etanol, embora existam questões relacionadas às queimas praticadas no canavial durante a etapa de colheita. Entretanto, a situação do etanol de milho nos Estados Unidos é um pouco diferente, uma vez que a produção do etanol apresenta uma alta demanda de energia proveniente de fontes fósseis. Estudos indicaram que as tecnologias de etanol de milho atuais são menos intensivas no uso de petróleo do que a gasolina, mas usam muito mais carvão e gás natural, possuindo assim emissões de GEE semelhantes às da gasolina (FARRELL *et al.*, 2006).

Outro ponto controverso deve-se ao fato de a produção de "*biocombustíveis de primeira geração*" competir diretamente com a produção de alimentos ao utilizar matérias-primas nobres e de uso alimentar e, mesmo caso não desloque alimentos para uso energético, deslocam a produção de alimentos ao ocupar terras férteis, que poderiam ser utilizadas para o cultivo (BOMTEMPO, 2011). No Brasil, a incorporação de novas áreas à agricultura de energia tem ocorrido sem competição com a agricultura de alimentos. Existe grande disponibilidade de terras com pastagens degradadas, nas quais a inserção da cana-de-açúcar é capaz de beneficiar também o pecuarista, que pode ter aumento na rentabilidade de sua propriedade rural e, ainda, melhorar a condição de fertilidade do solo (GOLDEMBERG *et al.*, 2008). Todavia, no

contexto norte-americano, o aumento do uso de milho para os biocombustíveis implica em preços mais elevados para os usuários do milho, incluindo a pecuária e setores de exportação.

Neste contexto, cada vez mais o mundo se volta para a exploração de biomassas residuais. O aproveitamento de resíduos provenientes da agroindústria pode ajudar a resolver problemas ambientais associados à disposição dos mesmos no meio ambiente. O desenvolvimento de processos biotecnológicos que aproveitem estes resíduos aparece com grande potencial devido à possibilidade de agregar valor a uma matéria-prima subutilizada. Adicionalmente, a sua utilização pode ocorrer sem que haja competição com a produção de alimentos.

O uso desses insumos, que possuem baixo custo, pode ainda impactar positivamente a economicidade dos processos de produção de etanol. No caso dos Estados Unidos, por exemplo, os custos com o milho, principal matéria-prima, equivalem a cerca de 60% do total dos custos operacionais das plantas industriais (PIMENTEL e PATZEK, 2005; PERKIS *et al.*, 2008).

Todas essas questões têm impulsionado a busca por inovações em processos e por diferentes matérias-primas. A busca pela matéria-prima ideal, ou pelas matérias-primas ideais, avança rapidamente. Os requisitos desejados para estas matérias-primas incluem múltiplos fatores, não facilmente conciliáveis, tais como: disponibilidade, preço, qualidade em relação ao processo de conversão e sustentabilidade ambiental (BOMTEMPO, 2011).

Os processos hoje existentes para produção de etanol de fontes amiláceas, como o milho, apresentam a necessidade de realização de hidrólise do material, fazendo com que o amido seja convertido a açúcares fermentescíveis, em geral por meio de um processo enzimático a elevadas temperaturas. As enzimas atuam como catalisadores dessa reação de hidrólise, sendo as amilases, como a glucoamilase e a α -amilase, as principais enzimas utilizadas, desempenhando um papel fundamental no aproveitamento de diversas biomassas contendo amido para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos.

Desta forma, esses processos apresentam elevados custos associados à obtenção das enzimas e elevada demanda energética, devido às altas temperaturas geralmente adotadas para a gelatinização e hidrólise do amido.

Portanto, a produção de amilases a partir de biomassas residuais deve ocorrer da forma mais econômica possível. Em processos biotecnológicos, uma estratégia para a condução de etapas de conversão microbiológica e produção de enzimas a baixo custo é a Fermentação no Estado Sólido (FES), devido à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais abundantes e baratos como matérias-primas (CASTILHO *et al.*, 2000b).

Com relação aos custos decorrentes da elevada demanda energética, os mesmos podem ser reduzidos se a etapa de hidrólise for realizada em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização do amido, ou seja, sobre o amido granular (processo conhecido como *cold hydrolysis*) (ROBERTSON *et al.*, 2006), propiciando vantagens sob o ponto de vista econômico. Neste processo, diferentemente dos processos convencionais, é necessária a ação conjunta de um “complexo” enzimático sobre o amido na forma granular, eliminando os processos de liquefação e cozimento e permitindo a redução no consumo de energia (GALVEZ, 2005).

O termo hidrólise do amido granular (ou hidrólise a frio) tem sido citado na literatura (TEXTOR *et al.*, 1998; GALVEZ, 2005; WANG *et al.*, 2005; SHARIFFA *et al.*, 2009). Entre outras vantagens deste processo em relação aos processos convencionais, pode-se citar: redução da viscosidade do meio líquido; menor investimento de capital; menores custos de manutenção e de insumos associados a estas operações e rendimentos potencialmente maiores.

Outra vantagem potencial apresentada por este processo se deve à sua condução envolvendo sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), tornando possível uma rápida conversão dos açúcares em etanol assim que eles são formados, diminuindo seu acúmulo no meio. Tendo em vista que os açúcares são inibitórios para o processo, a utilização de SSF aumenta os rendimentos e as concentrações de etanol, em comparação com processos nos quais essas etapas são realizadas separadamente (WYMAN *et al.*, 1992; CARDONA e SÁNCHEZ, 2007).

Neste contexto, o presente trabalho teve como finalidade investigar o uso de resíduos agroindustriais, não convencionais, à base de amido, tanto para produzir um complexo enzimático quanto para a produção de um meio de cultivo com alta concentração de glicose, o qual foi avaliado para a produção de etanol. Embora todo foco deste trabalho tenha sido na obtenção de etanol, o meio de cultivo genérico rico em glicose pode ser usado como bloco de construção para diversas bioconversões dentro do conceito de biorrefinaria.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de um processo para produção de etanol a partir de um resíduo agroindustrial rico em amido (farinha de babaçu), com uso de complexos enzimáticos próprios produzidos por fermentação no estado sólido, para a hidrólise granular do amido, de forma simultânea à fermentação.

Para tal, os objetivos específicos foram:

- Produção de complexos enzimáticos contendo amilases e outras hidrolases, pelo processo de fermentação no estado sólido (FES) de um resíduo da indústria do óleo de babaçu, utilizando o fungo *Aspergillus awamori* IOC-3914;
- Caracterização do extrato enzimático próprio, incluindo quantificação de atividade das enzimas amilolíticas, bem com de enzimas acessórias (xilanolíticas, celulolíticas e proteolíticas).
- Estudo e desenvolvimento do processo de hidrólise do amido granular, utilizando as enzimas próprias para a hidrólise do mesmo resíduo agroindustrial (farinha de babaçu);
- Comparação do potencial hidrolítico dos complexos enzimáticos próprios, com o de preparados comerciais;
- Produção de um meio de nutrientes completo e com alta concentração de glicose;
- Avaliação da etapa de fermentação alcoólica por diferentes linhagens de leveduras;
- Desenvolvimento de um processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) para produção de etanol a partir de amido granular;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A matéria-prima

3.1.1 Biomassa e os resíduos agroindustriais

Biomassa é definida como qualquer matéria orgânica de origem vegetal, seja esta cultivada em terra ou em água, proveniente de produtos animais e seus resíduos, subprodutos de processamentos agrícolas e industriais, plantas aquáticas, resíduos agrícolas e agroindustriais, resíduos de papel e madeira, entre outros, incluindo os resíduos urbanos (NREL, 2011).

A produção de biomassa, como resultado da reação de fotossíntese, depende essencialmente da energia solar e da presença de água e dióxido de carbono (CO₂), além de outros requisitos importantes associados à incorporação de nutrientes, como a fertilidade do solo, por exemplo. A energia, denominada de bioenergia, é então armazenada nas ligações químicas dos componentes estruturais da biomassa mediante processos fotossintéticos (BNDES, 2008).

Desta forma, as biomassas apresentam um potencial significativo para geração de energia e, mais do que isso, para a produção de uma série de produtos químicos, materiais e combustíveis (CLARK *et al.*, 2006). Neste contexto, os resíduos despertam grande interesse, visando a sua conversão em uma gama de bioprodutos de maior valor agregado, processo este conhecido como valorização de resíduos agroindustriais. A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis, como o etanol, apresenta vantagens, principalmente econômicas e ambientais, frente aos processos industriais que utilizam cultivos de biomassa de composição amilácea (PANDEY *et al.*, 2000b; RATTANACHOMSRI *et al.*, 2009). O aproveitamento de resíduos provenientes de outros processos propicia o uso de insumos de baixo custo, evita o indesejado acúmulo dessas biomassas no meio ambiente, e sua utilização pode ser implantada sem que haja competição direta com a alimentação humana.

Em processos biotecnológicos, a utilização de biomassas residuais como matérias-primas tem o potencial de tornar os processos mais econômicos,

efetivamente agregando valor à cadeia produtiva. No que diz respeito à produção de enzimas, entre outros bioprodutos, uma estratégia para a condução de etapas de conversão microbiológica a baixo custo é a fermentação no estado sólido (PANDEY *et al.*, 2000b; VINIEGRA-GONZALEZ *et al.*, 2003).

3.1.2 Matérias-primas amiláceas

O amido é o produto final do processo fotossintético e constitui a reserva de carbono das plantas. A sua formação ocorre devido à atividade de enzimas, tanto em organelas fotossinteticamente ativas, onde o amido constitui uma reserva temporária, quanto nos amiloplastos (CEREDA, 2002).

Desta forma, o amido é a principal reserva energética das plantas. As principais fontes de amido são (LEONEL e CEREDA, 2002): cereais, tais como milho, trigo, arroz, cevada, sorgo; tubérculos ou raízes, particularmente batata, batata-doce, mandioca e mandioquinha-salsa; ou ainda oleaginosas, como, por exemplo, mamona, pinhão manso, dendê, canola, girassol, babaçu e soja, em que o amido concentra-se nas porções residuais obtidas após o processamento para a extração dos óleos.

O milho (*Zea mays spp.*) é originário do México, sendo cultivado atualmente em todos os continentes, e ocupa, aproximadamente, 162 milhões de hectares, nos quais foram produzidos 812 milhões de toneladas em 2010 (FAOSTAT, 2011), constituindo um importante componente da oferta de alimentos em vários países, como alimento humano e animal. Os Estados Unidos lideram a produção de milho e respondem por 332 milhões de toneladas (em 33 milhões de hectares) (CRA, 2010). No contexto norte-americano no que diz respeito à produção de etanol, o milho é a matéria-prima utilizada na produção de 98% desse biocombustível (BNDES, 2008) e, do total de milho produzido, cerca de 40% é destinado para produção de etanol (CRA, 2010).

Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho (PAES, 2006). Através de uma colheita mecanizada, a espiga é separada do colmo e os grãos são extraídos da espiga, deixando a palha e o sabugo já no campo (BNDES, 2008).

Conhecido botanicamente como uma cariopse, o grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (*tip cap*), as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão (PAES, 2006). O amido está presente no endosperma, ligado quimicamente às proteínas. SRICHUWONG *et al.* (2010) estudaram a composição de diferentes grãos de milho utilizados para a produção de etanol combustível nos Estados Unidos, obtendo uma faixa de 69-75 % em base seca de amido. A Tabela 3.1 mostra a composição dos grãos de milho, bem como de outras matérias-primas amiláceas (ROEHR, 2001; KOUTINAS *et al.*, 2004; PAES, 2006; SRICHUWONG *et al.*, 2010; AI *et al.*, 2011).

Tabela 3.1: Composição de matérias-primas amiláceas (% em massa seca)

Matéria-prima	Amido	Gordura	Proteína	Fibra	Cinzas	Referências
Grão de milho	72,7	3,4	10,1	5,2	1,9	(PAES, 2006); (SRICHUWONG <i>et al.</i> , 2010)
Grão de cevada	63,2	2,2	11,8	5,3	2,8	(ROEHR, 2001)
Grão de sorgo	70,9	3,3	11,3	3,4	2,8	(ROEHR, 2001); (AI <i>et al.</i> , 2011)
Farinha de trigo	83,2	2,3	12,7	2,3	2,0	(KOUTINAS <i>et al.</i> , 2004); (ROEHR, 2001)
Farinha de mandioca	85,3	0,5	1,4	2,3	1,6	(ROEHR, 2001)

KOUTINAS *et al.* (2004) discutiram a viabilidade da produção de uma vasta gama de produtos químicos a partir do trigo, além dos potenciais usos para biocombustíveis e plásticos biodegradáveis.

No entanto, existem outras espécies que são atualmente pouco exploradas e subaproveitadas, sendo uma destas o fruto da palmeira do babaçu.

3.1.3 O babaçu

O babaçu (*Orbignya phalerata*) é uma palmeira brasileira de grande porte (até 20 metros), apresenta de 15 a 25 frutos por cacho e, normalmente, quatro cachos por árvore. Os frutos (chamados de cocos) de forma elipsoidal pesam em geral entre 90 e 280 g cada (TEIXEIRA, 2002).

Estes frutos possuem quatro frações, representadas na Figura 3.1: epicarpo; mesocarpo; endocarpo e amêndoas. A composição típica dos cocos é de: 12 % (m/m) de epicarpo fibroso; 23 % (m/m) de mesocarpo amiláceo fibroso; 58 % (m/m) de endocarpo; e 7 % (m/m) de amêndoas (PAVLAK *et al.*, 2007).

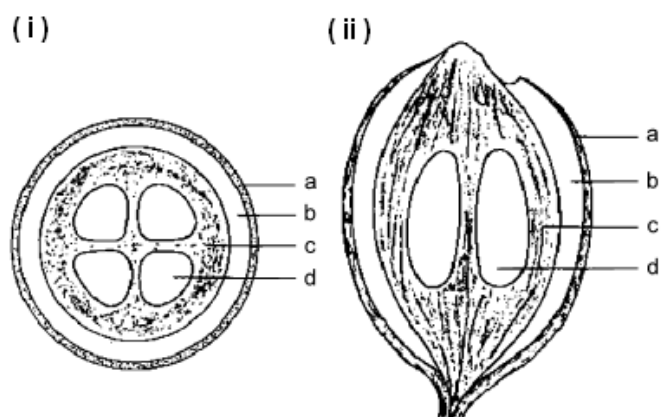


Figura 3.1: Cortes do coco de babaçu: Transversal (i) e longitudinal (ii). Componentes do externo para o interno: epicarpo-a; mesocarpo-b; endocarpo-c; e amêndoa-d. **Fonte:** TEIXEIRA (2008).

Estudos buscam investigar o potencial uso energético do babaçu, em uma série de produtos e subprodutos diferentes, como carvão, etanol, alcatrão, óleo, sabão, entre outros (BARUQUE FILHO *et al.*, 2000; DESER, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2011).

Apesar de alguns estudos sobre outros potenciais usos, atualmente, o principal interesse da exploração do babaçu concentra-se nas amêndoas do fruto, das quais é extraído o óleo de babaçu. O esmagamento do coco de babaçu produz dois tipos de óleo: um para fins comestíveis e outro para fins industriais (óleo láurico). Estes óleos, de maneira geral, são usados como azeite de babaçu, margarina, lubrificante e, ainda, para a fabricação de detergentes, perfumes e cosméticos (DESER, 2007). Estudos recentes mostraram sua possível aplicação na produção de biodiesel (LIMA *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2009).

O babaçu ocorre na região do Norte e Nordeste do Brasil em uma área de aproximadamente 13,4 milhões de hectares (FERREIRA, 1999). No ano de 2009, a produção de óleo de babaçu foi de 109 299 toneladas, principalmente nos estados do

Piauí, Tocantins e Maranhão (IBGE, 2011). Os dados relativos à produtividade de coco de babaçu são divergentes, mas esta se situa numa faixa de 2,0–2,5 t/(ha ano) para as regiões em que esses frutos são explorados (BARUQUE FILHO *et al.*, 1998). Considerando-se que apenas 33 % destas palmeiras são produtivas, a produção potencial pode ser estimada em 11 milhões de toneladas de coco por ano.

Segundo FERREIRA (1999), a exploração de babaçu, apesar de sua importância sócio-econômica regional e nacional, tem crescido de forma rudimentar. Apesar da grande concentração de palmeiras de babaçu, o rendimento de seu fruto é relativamente baixo, devido à ausência de desenvolvimento tecnológico mais intensivo e à carência de políticas sociais, fatores estes que modulam uma realidade de intervenção desorganizada da floresta (FERREIRA, 1999).

Existe um impacto social positivo considerável, associado às cadeias produtivas, no que diz respeito às atividades extrativas do babaçu. Toda a produção de amêndoa de babaçu é feita em regime de economia familiar, portanto, esta atividade é uma parte significativa da renda financeira para essas famílias. Estima-se que cerca de dois milhões de pessoas estejam envolvidas nestas atividades (TEIXEIRA, 2002) e que ao menos 300 mil mulheres estejam empregadas no trabalho manual de quebrar a casca do fruto (sendo conhecidas como quebradeiras de coco), de onde obtêm suas fontes de renda principais ou complementares (DESER, 2007).

A torta da amêndoa do babaçu é um subproduto do processo de extração mecânica do óleo da amêndoa de babaçu. A fração de torta gerada, que é de 34 % em massa da amêndoa (DESER, 2007), é composta principalmente de proteína (22,8 % m/m), carboidratos (61,8 % m/m) e lipídios residuais (4,5 % m/m) (GOMBERT *et al.*, 1999).

Embora o epicarpo, o endocarpo e o mesocarpo do coco do babaçu possuam potenciais usos, como no caso da farinha do mesocarpo para nutrição animal, em alguns casos, após a retirada da amêndoa, a fruta inteira é carbonizada para produzir carvão vegetal (TEIXEIRA, 2008).

A farinha de babaçu pode ser obtida a partir do esmagamento mecânico do mesocarpo de coco, tem uma cor castanha devido aos taninos e apresenta em média

um teor de amido, quando processada industrialmente, de 50 % (m/m) em base de sólidos totais (BARUQUE FILHO *et al.*, 2000). A Tabela 3.2 mostra a composição média da farinha de babaçu industrial.

Tabela 3.2: Composição média da farinha do mesocarpo de babaçu (processada industrialmente). **Fonte:** BARUQUE FILHO *et al.* (2000).

Componentes	Composição (%)
Umidade	14
Amido	50
Proteína	2,3
Fibras	10
Gordura	2,8
Cinzas	1,3
Pentosanas	3,4
Carboidratos solúveis	1,3

3.1.4 O amido

3.1.4.1 Estrutura química do amido

O amido é a principal reserva de alimento das plantas, sendo sintetizado na forma de grânulos de geometria aproximadamente esférica, em organelas celulares em uma série de diferentes tecidos das plantas (TESTER *et al.*, 2006). Os grânulos são caracterizados como estruturas semicristalinas e possuem dimensões que variam de acordo com a fonte botânica, com uma granulometria variável em uma faixa de 1-110 μm de diâmetro (HOOVER, 2001). Os grânulos de amido de arroz estão entre os menores, variando de 3 a 5 μm de diâmetro, enquanto os de amido de batata (10-110 μm) estão entre os maiores. Os grânulos de amido de milho variam entre 5 e 26 μm com um diâmetro médio de 15 μm (SINGH *et al.*, 2003).

O amido é um homopolissacarídeo ramificado de unidades D-glicose, constituído por duas porções distintas, sendo estas (Figura 3.2): amilose, que é um polímero linear no qual as moléculas de glicose encontram-se unidas por ligações do tipo α -1,4 entre as unidades de glicose e que corresponde tipicamente a 15-30 % da massa total do amido; e amilopectina, que representa a região ramificada do amido, devido à presença de ligações do tipo α -1,6 (CORRADINI *et al.*, 2005).

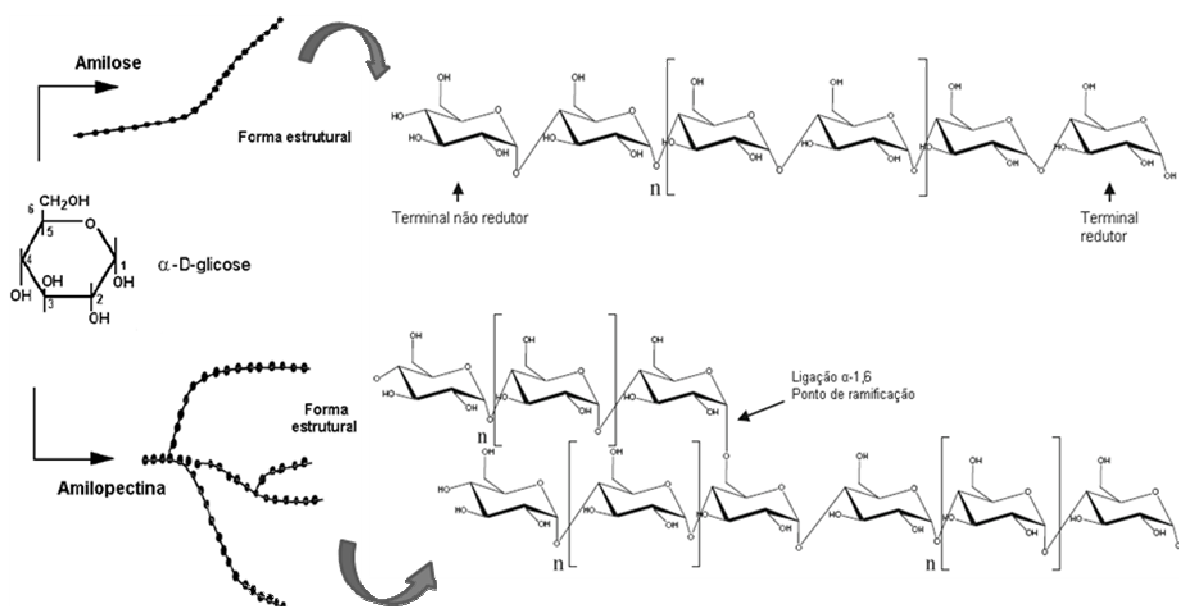


Figura 3.2: Estrutura dos componentes do amido. **Fonte:** Adaptado de MURPHY (2000) e CASTRO *et al.* (2011a).

A glicose, unidade de construção do polissacarídeo, apresenta isomeria ótica devido à existência de um carbono quiral (ou assimétrico). Esta isomeria se caracteriza pelo desvio do plano da luz polarizada para a direita, dextrógero (D), ou para a esquerda, levógero (L), e refere-se ao carbono assimétrico mais distante a partir do grupo aldeído. Naturalmente a glicose se apresenta principalmente na forma D-glicose. A forma cíclica da glicose também pode ser vista na Figura 3.2, com o sistema de numeração para os átomos de carbono na estrutura. O carbono de número 1 é denominado de carbono anomérico (responsável pela formação da ligação glicosídica) e sua presença indica o caráter redutor do açúcar. Quando o grupo hidroxila (OH) do carbono anomérico está presente abaixo da estrutura do anel de D-glicose, diz-se que o açúcar apresenta configuração α (alpha). Quando o grupo hidroxila no C1 está acima do anel, diz-se que o açúcar apresenta configuração β (beta) (POWER, 2003).

A amilose tem uma faixa de massa molar média de aproximadamente 10^5 - 10^6 g/mol e pode conter cerca de 2-11 cadeias com entre 200 e 700 resíduos de glicose por cadeia, correspondendo a um grau de polimerização de 1 000 a 10 000 (TESTER e KARKALAS, 2001).

No que diz respeito à amilopectina, esta é um polímero muito maior, com massa molar na faixa de 10^7 - 10^9 g/mol e um grau de polimerização que pode ser

superior a 10^6 . A maioria dos amidos contém 60-90 % de amilopectina em massa (COPELAND *et al.*, 2009).

A cristalinidade dos grânulos de amido é atribuída principalmente à amilopectina. Esta possui uma estrutura organizada na forma de *clusters*, nos quais são alternadas regiões empacotadas, altamente ordenadas, de cadeias dispostas em paralelo, com regiões menos ordenadas, nas quais predominam as porções ramificadas. As lamelas cristalinas e amorfas são dispostas na forma de anéis dentro dos grânulos de amido (OATES, 1997). A amilose, embora seja linear, apresenta uma conformação que dificulta sua associação regular com outras cadeias (CORRADINI *et al.*, 2005), sendo assumida como uma porção independente, que se dispõe aleatoriamente nos grânulos entre as regiões amorfas e cristalinas da amilopectina, como uma fração móvel (OATES, 1997).

A gelatinização consiste no colapso (rompimento) da ordem das moléculas dentro dos grânulos de amido com mudanças irreversíveis nas propriedades, como o aumento dos grânulos, fusão de cristais, perda da ordem cristalina, aumento da viscosidade (SINGH *et al.*, 2003; BENINCA, 2008). A gelatinização ocorre inicialmente na região amorfa do grânulo (no hilo) e segue rapidamente para a periferia (SINGH *et al.*, 2003). Na temperatura de gelatinização as ligações de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina tornam-se mais fracas e são rompidas, promovendo redução da cristalinidade, o que possibilita a entrada de água e inchaço dos grânulos (HOOVER, 2001).

Essas temperaturas de gelatinização variam entre os amidos de diferentes fontes. SINGH *et al.* (2003) citam valores na faixa de 61 a 72°C para a batata, 68 a 74°C para o milho, 65 a 79°C para o arroz e 56 a 62°C para o trigo. Os amidos de farinha de mandioca e de batata-doce apresentam, respectivamente, valores de 70,4°C e 74,2°C (SHARIFFA *et al.*, 2009). ALMEIDA *et al.* (2011) investigaram o comportamento térmico da farinha de babaçu e obtiveram uma temperatura de gelatinização de 73°C para o amido da farinha de babaçu nativa. Estas diferenças de temperaturas entre os diferentes amidos podem ser atribuídas a diferenças no grau de cristalinidade. Temperaturas elevadas têm sido relatadas como resultado de um elevado grau de

cristalinidade, o que fornece uma maior estabilidade estrutural e faz com que os grânulos sejam mais resistentes à gelatinização (HOOVER, 2001; SINGH *et al.*, 2003).

As interações moleculares, principalmente ligações de hidrogênio entre as cadeias de amido, podem sofrer, após o resfriamento do amido gelatinizado, um processo denominado retrogradação (HOOVER, 2001). Segundo ATWELL *et al.* (1988) *apud* BENINCA (2008) a retrogradação do amido é o evento que ocorre quando as moléculas de amido começam a se reassociar em uma estrutura mais ordenada (duplas hélices), tornando-se menos solúveis. Sob condições favoráveis, esta estrutura ordenada pode se desenvolver em uma forma cristalina, formando partículas de maior tamanho que, por essa razão, podem precipitar.

Além da amilose e da amilopectina, que compõem 98-99 % do peso seco de grânulos nativos de amido (BENINCA, 2008), os grânulos de amido apresentam outros constituintes. Estes componentes, chamados de constituintes menores (ou secundários), encontram-se associados com o amido e se enquadram, principalmente, em três categorias: (i) provenientes de fragmentos da parede celular; (ii) componentes superficiais; e (iii) componentes internos (BULÉON *et al.*, 1998). Esses componentes são, principalmente, lipídeos, fósforo, proteínas, minerais e sais. Na superfície desses grânulos estão presentes, além das proteínas, enzimas, aminoácidos e ácidos nucleicos (BULÉON *et al.*, 1998; HOOVER, 2001).

A presença de lipídeos pode alterar significativamente as propriedades e funcionalidades do amido (BULÉON *et al.*, 1998). A formação de complexo do amido com lipídeos reduz a solubilidade do amido em água, altera suas propriedades reológicas, diminui sua capacidade de inchaço, provoca o aumento da temperatura de gelatinização, reduz a rigidez do gel, retarda a retrogradação e causa, ainda, menor susceptibilidade à hidrólise enzimática (COPELAND *et al.*, 2009).

3.2 As enzimas envolvidas na degradação do amido

3.2.1 Enzimas

As enzimas são substâncias orgânicas compostas por sequências de aminoácidos (proteínas), que atuam como catalisadores em diversas reações

bioquímicas e desempenham um papel fundamental no metabolismo dos seres vivos. Apresentam conformações com arranjos espaciais e um enovelamento específico, sendo que suas propriedades, estabilidade e função estão relacionadas com sua estrutura tridimensional.

As enzimas são provavelmente as moléculas biológicas mais intensamente estudadas. Constituem um conjunto de ferramentas da natureza para construir e destruir as moléculas necessárias para a vida, crescimento e morte de todos os organismos. Praticamente todos os processos biológicos exigem uma enzima em algum ponto, e as enzimas são capazes de realizar transformações químicas extremamente complexas e específicas em condições fisiológicas (pressão atmosférica, temperatura e pH fisiológicos, em um ambiente aquoso) (HOLLIDAY *et al.*, 2007).

O princípio básico da catálise enzimática é a capacidade de uma enzima diminuir a energia do estado de transição. Com a diminuição da energia de ativação, a reação termodinamicamente favorável passa a ser, também, cineticamente favorável. As enzimas apresentam propriedades de alta especificidade e seletividade química, podem ser empregadas como catalisadores em diversas reações químicas e possuem uma elevada importância em processos biotecnológicos.

A área de biocombustíveis, bem como as de alimentos, farmacêutica, ambiental e de química fina, tem impulsionado o estudo e desenvolvimento de biocatalisadores, com pesquisas relacionadas à catálise enzimática, visando a compreensão da estabilidade, estrutura e mecanismos de ação das enzimas.

3.2.2 Amilases

A história das amilases teve início por volta de 1811, quando uma enzima capaz de degradar o amido foi descoberta por Kirchhoff (GUPTA *et al.*, 2003). As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais. No início de sua comercialização, destinava-se ao setor farmacêutico, visando ao tratamento de distúrbios digestivos. Atualmente, as amilases apresentam aplicações na indústria têxtil, detergentes, panificação, cervejaria, papel e celulose, entre outras (COELHO *et al.*, 2008). No presente estudo, as amilases foram utilizadas na hidrólise do amido, visando principalmente à produção de etanol combustível.

3.2.2.1 Classificação e mecanismo de ação

A *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) classifica as enzimas em seis grandes grupos (classes), de acordo com o tipo de reação que catalisam. Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por "E.C." (*Enzyme Commission of the IUBMB*), que é composto por 4 dígitos. Segundo essa classificação, as amilases estão presentes: na classe das transferases (EC 2.x.x.x), dentro da sub-subclasse das hexosiltransferases (EC 2.4.1.x); na classe das isomerases (EC 5.x.x.x), no caso das mutases transferidoras de outros grupos (EC 5.4.99.x); e na classe das hidrolases (EC 3.x.x.x), pertencentes à sub-subclasse das glicosidases (EC 3.2.1.x). A esta classe, das hidrolases, pertencem às amilases de maior interesse industrial, que constituem também o principal alvo de interesse neste trabalho.

As enzimas amilolíticas atuam sinergicamente sobre seu substrato de ação, o amido, degradando este polissacarídeo em oligossacarídeos e glicose. Desta forma são necessárias diversas enzimas agindo em conjunto para converter completamente o amido em glicose. As enzimas amilolíticas da classe das hidrolases podem ser classificadas em três grupos (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002; IUBMB, 2011):

- I. **Endoamilases:** catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 no interior do polímero de forma randômica, gerando oligossacarídeos lineares e ramificados. Dentre estas, a mais conhecida é a α -amilase (EC 3.2.1.1.). Os produtos finais de hidrólise da α -amilase são oligossacarídeos com comprimento variável e uma configuração α , a partir de seu ataque randômico a moléculas com pelo menos três unidades de glicose.
- II. **Exoamilases:** agem nas extremidades das cadeias de amilose e amilopectina catalisando a hidrólise tanto exclusivamente sobre ligações α -1,4, quanto sobre ligações α -1,4 e α -1,6. Entre as principais pode-se citar:
 - A β -amilase (EC 3.2.1.2) atua somente sobre ligações α -1,4, a partir de terminais não redutores das cadeias, e o principal produto de hidrólise liberado é a β -maltose (dissacarídeo de glicose);
 - A glucoamilase (EC 3.2.1.3), cujo nome sistemático é glucana 1,4- α -glicosidase, também denominada 1,4- α -D glucana glucohidrolase,

amiloglucosidase, exo-1,4- α -glicosidase, γ -amilase, maltase ácida e α -amilase lisossômica, atua sobre ligações α -1,4, liberando unidades de β -glicose dos terminais não redutores das cadeias. Possui também capacidade de atuar sobre ligações α -1,6;

- A α -glicosidase (EC 3.2.1.20), também conhecida como maltase, glicoinvertase, glicoseidosucrase, glucoamilase-maltase. Ataca preferencialmente oligossacarídeos (a hidrólise de polissacarídeos ocorre com taxas mais lentas), liberando moléculas de α -D-glicose de seus terminais não redutores;
- A exo-maltotetrahidrolase libera unidades de maltotriose (três unidades de glicose), maltohexaose (seis unidades de glicose) e, principalmente, maltotetraose (quatro unidades de glicose) dos terminais não redutores das cadeias polissacarídicas de amido;
- A α -amilase maltogênica ou 1,4- α -D glucana maltohidrolase, atua nas ligações α -1,4 liberando unidades de α -maltose dos terminais não redutores de cadeias poliméricas e oligoméricas.

III. **Enzimas desramificadoras:** catalisam a hidrólise exclusivamente de ligações α -1,6 presentes nos pontos de ramificação da amilopectina. As principais são as isoamilases (EC 3.2.1.68) e pululanases (EC 3.2.1.41).

A atuação das principais enzimas amilolíticas sobre o amido é apresentada esquematicamente na Figura 3.3. A ação sinérgica das mesmas favorece a hidrólise do amido, uma vez que aumenta a taxa de reação global e diminui a inibição pelos produtos das reações (FUJII *et al.*, 1988; LYND *et al.*, 2002).

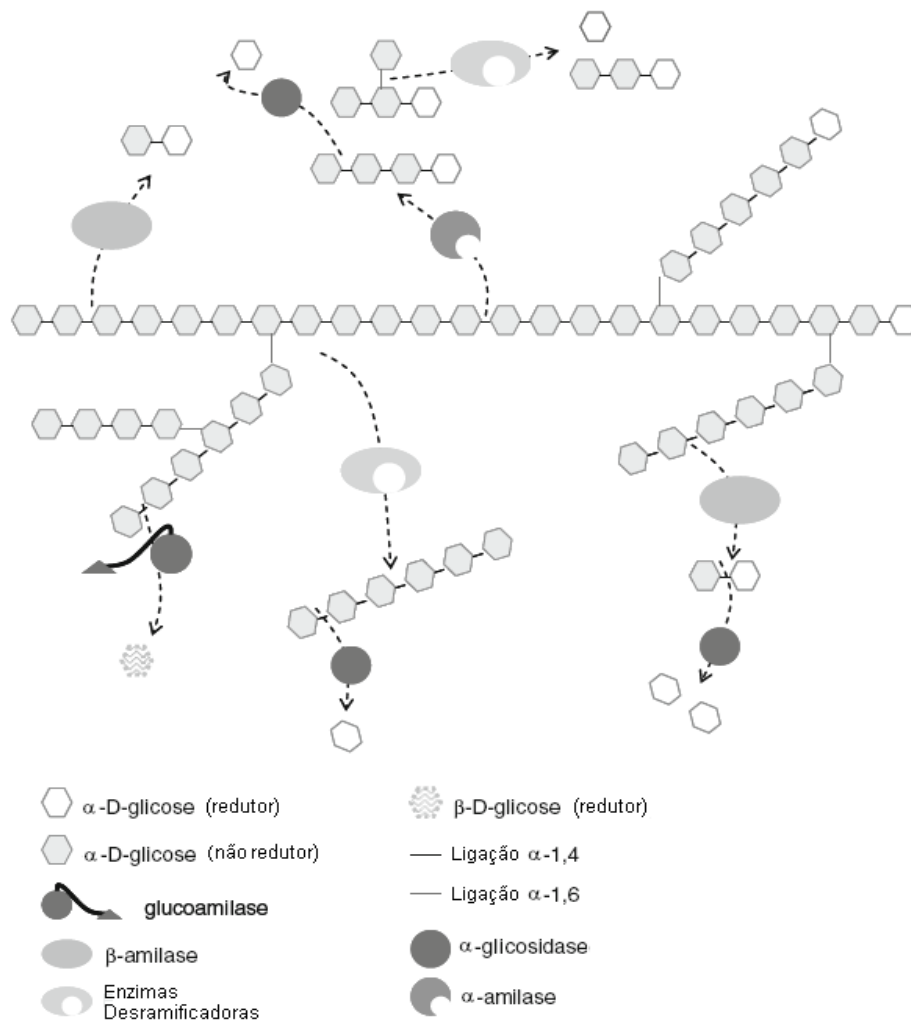


Figura 3.3: Ação das amilases sobre estrutura do amido. Fonte: Adaptado de CASTRO *et al.* (2011a).

FUJII *et al.* (1988) estudaram a hidrólise de grânulos de amido, com α -amilase e glucoamilase, e observaram que a taxa formação de glicose pelo sistema com essas duas enzimas foi mais que duas vezes maior do que a soma das taxas individuais de cada enzima. Este efeito foi atribuído à ação da α -amilase que atua aleatoriamente sobre as moléculas do amido na superfície dos grânulos, fornecendo novos grupos terminais não redutores para ação da glucoamilase. Como a maioria dessas moléculas clivadas permanece na superfície dos grânulos, a glucoamilase atua sobre essas moléculas na superfície liberando glicose sucessivamente, ou seja, descamando a superfície do grânulo, expondo novos substratos para a α -amilase. A sinergia ocorre devido à cooperação entre essas enzimas.

As glucoamilases fúngicas são enzimas que possuem três domínios, um domínio catalítico (DC); um domínio de ligação ao amido (DLA) e uma região glicosilada de ligação que conecta esses dois domínios (Figura 3.4).

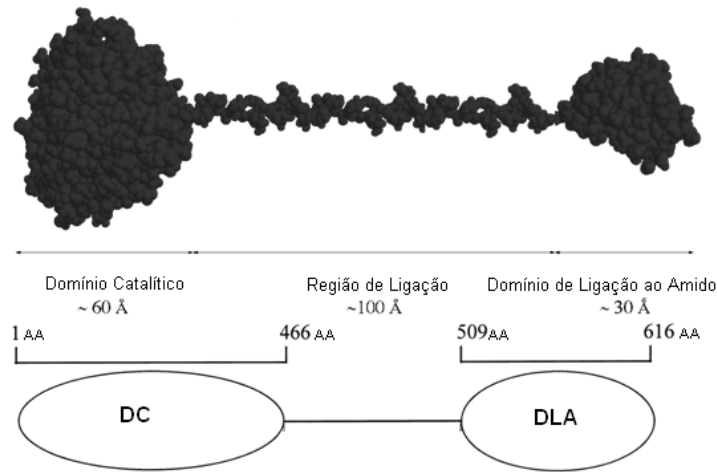


Figura 3.4: Representação esquemática das regiões de uma glucoamilase de *Aspergillus niger*. Neste exemplo o domínio catalítico vai do aminoácido 1 ao 466 e o domínio de ligação ao amido do aminoácido 509 ao 616. **Fonte:** Adaptado de SAUER *et al.* (2000).

O mecanismo amplamente aceito de hidrólise para esta amilase envolve: a transferência de prótons de um catalisador ácido para o oxigênio da ligação glicosídica; formação de um intermediário, o íon oxocarbenium; e um ataque nucleofílico da água, assistida por um catalisador básico. Na catálise desta enzima de *A. niger* (Figura 3.5) foram identificados os resíduos Glu179 e Glu400 como o catalisador ácido e básico, respectivamente, da reação, presentes no DC da enzima (SAUER *et al.*, 2000). A reação ocorre ainda com a inversão da configuração do carbono anomérico, tendo como produto de reação a β -glicose.

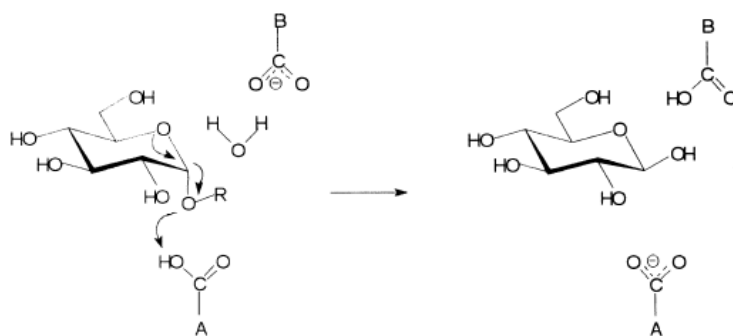


Figura 3.5: O mecanismo catalítico de glucoamilase ilustrando a ação da base catalítica Glu400 (superior) e catalisador ácido Glu179 (abaixo) na hidrólise assistida da água do substrato envolvendo inversão da configuração do carbono anomérico. **Fonte:** SAUER *et al.* (2000).

3.2.2.2 Propriedades gerais

As propriedades físico-químicas e enzimáticas de amilases de vários microrganismos têm sido amplamente estudadas e descritas na literatura (BHELLA e ALTOSAAR, 1985; ONO *et al.*, 1988; NAGASAKA *et al.*, 1998; RAMACHANDRAN *et al.*, 2004; SUGANUMA *et al.*, 2007; UEDA *et al.*, 2008; NEGI e BANERJEE, 2009).

A seguir serão abordadas as características de algumas enzimas amilolíticas. Diversas variáveis e parâmetros físicos afetam suas propriedades, como a estabilidade e condições ótimas de atuação. Dessa forma, a Tabela 3.3 apresenta valores de algumas propriedades importantes na caracterização de enzimas α -amilases e glucoamilases de fungos filamentosos. Observa-se que estas enzimas apresentam uma massa molar na faixa entre 54 e 100 kDa.

Com relação aos valores ótimos de pH, as amilases se encontram na faixa ácida (4,0-5,0). Podem ser observados, ainda, dados referentes ao ponto isoelétrico (PI) das enzimas, que se caracteriza pelo pH no qual a proteína apresenta carga líquida igual a zero, ou seja, no qual as cargas dos resíduos de aminoácidos se anulam. Nota-se que os valores de PI estão dentro, ou muito próximos, da faixa de pH ótimo, o que está relacionado com o mecanismo descrito de ação de amilases, mostrando que as cargas dos resíduos da enzima apresentam um papel fundamental na catálise. Com a utilização de um *software* de bioinformática pode-se calcular estes valores de PI teóricos a partir da estrutura primária da proteína, da massa molar e de outras informações (EXPASY, 2012).

Tabela 3.3: Propriedades de algumas amilases fúngicas. NR: valores não reportados.

Enzima / Fonte	Massa Molar (kDa)	pH ótimo	PI	Temperatura ótima (°C)	Referências
α -amilase (<i>Aspergillus awamori</i>)	54,9	NR	4,52	NR	EXPASY (2012)
α -amilase (<i>Aspergillus usamii</i>)	57-100	4,5-5,0	NR	50-65	SUGANUMA <i>et al.</i> (2007)
α -amilase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	68	5,0	NR	50	RAMACHANDRAN <i>et al.</i> (2004)
α -amilase (<i>Aspergillus awamori</i>)	54	4,8-5,0	4,2	50	BHELLA e ALTOSAAR (1985)
Glucoamilase (<i>Aspergillus awamori</i>)	68,3	NR	4,25	NR	EXPASY (2012)
Glucoamilase (<i>Aspergillus niger</i>)	58-99	4,0-5,0	NR	55-65	ONO <i>et al.</i> (1988)
Glucoamilase (<i>Aspergillus awamori</i>)	NR	5,0	NR	70	NEGI e BANERJEE (2009)
Glucoamilase (<i>Corticium rolfsii</i>)	69-79	4,5	3,8-4,1	60	NAGASAKA <i>et al.</i> (1998)
Glucoamilase (<i>Humicola sp.</i>)	72,8	4,7	NR	55	RIAZ <i>et al.</i> (2007)

A respeito da temperatura ótima de atuação para essas enzimas, observa-se na Tabela 3.3 que ela se encontra em uma faixa de 50 a 70°C. Em geral, as amilases fúngicas apresentam massas molares superiores às produzidas por procaríotos, principalmente as bacterianas. As amilases produzidas por bactérias podem apresentar características mais distantes dessas faixas, como, por exemplo, ter sua massa molar variando de 28 a 78 kDa e capacidade de atuar em pH neutro ou até em valores de pH alcalinos. Com relação à temperatura, amilases bacterianas podem chegar a atuar em temperaturas superiores a 100°C (GUPTA *et al.*, 2003). De forma geral, as enzimas fúngicas, pela natureza de seus microrganismos produtores, são menos termotolerantes do que as bacterianas. As principais α -amilases comerciais, voltadas para a produção convencional de etanol combustível, são produzidas por espécies de *Bacillus*. Devido às condições de cozimento do amido, a escolha de α -amilases baseia-se, principalmente, na sua tolerância a altas temperaturas (POWER, 2003).

Outra diferença das amilases fúngicas em relação às bacterianas se deve à adição de carboidratos na estrutura da proteína. A glicosilação é uma das principais

modificações pós-traducionais, que pode afetar uma variedade de funções das enzimas, incluindo secreção, estabilidade e enovelamento da proteína e contribui, ainda, para o aumento de sua resistência a ataques proteolíticos (KUBICEK *et al.*, 1993). As amilases fúngicas são normalmente altamente glicosiladas enquanto que a glicosilação de proteínas em bactérias é um processo raro, já que são procariotos e não apresentam tais modificações (GUPTA *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2009). O teor de carboidratos em glucoamilases de fungos pode chegar a cerca de 5-20 % da massa molar. Tipicamente estes carboidratos são compostos por manose, glicosamina, glicose e galactose (UEDA, 1981).

As glucoamilases fúngicas comercialmente disponíveis são, em sua maioria, produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*. Estas apresentam, conforme discutido anteriormente, atividade ótima em torno de 50°C, porém apresentam perda de estabilidade acima desta faixa de temperatura, sendo inativadas em temperaturas próximas a 60°C. Ou seja, a condição ótima de temperatura para essas enzimas não corresponde à sua condição ótima de estabilidade. RIAZ *et al.* (2007) mostraram que a glucoamilase é muito estável a 45°C, porém apresenta perda de atividade a 55°C. Outros estudos mostram que, para as amilases fúngicas, temperaturas acima de 60°C levam a uma forte diminuição de estabilidade e conseqüente perda de atividade catalítica (NAGASAKA *et al.*, 1998; GUPTA *et al.*, 2003). Os resultados de NEGI e BANERJEE (2009) com glucoamilase de *A. awamori* mostraram que o tempo de meia-vida das enzimas foi de 210 min a 50°C, 120 min a 60°C, 60 min a 70°C e 35 min a 80°C. A meia-vida ($t_{1/2}$) de uma enzima, a uma temperatura constante, é o tempo que leva para a sua atividade se reduzir à metade da atividade inicial.

É importante ressaltar, ainda, a importância de alguns íons na estabilidade das enzimas. Na presença de íons Ca^{2+} , por exemplo, as amilases são mais termoestáveis do que na ausência dos mesmos (GUPTA *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que o papel do íon cálcio seria principalmente estrutural, pois este fica situado longe do sítio ativo para participar diretamente na catálise. O efeito estabilizador do íon cálcio na termoestabilidade da enzima poderia ser explicado pelo efeito *salting out* de resíduos hidrofóbicos na proteína por íons de cálcio, causando assim a adoção de uma estrutura compacta (PRAKASH e JAISWAL, 2010).

3.2.3 Produção de amilases

Apesar de poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, as enzimas produzidas por fungos e bactérias são, hoje, as principais na indústria e são amplamente utilizadas para hidrólise e processamento do amido (PANDEY *et al.*, 2000a).

As duas principais estratégias para a produção de amilases são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS), que diferem entre si em relação a suas condições ambientais e formas de condução.

3.2.3.1 A fermentação no estado sólido

Fermentações no estado sólido têm sido utilizadas desde a antiguidade, principalmente na produção de artigos alimentícios, como queijos, cogumelos e molho de soja. O uso no preparo do molho de soja *koji* na China, no Japão e no Sudeste Asiático, remonta de 1 000 a 3 000 anos atrás (PANDEY, 1992), porém os processos de FES foram quase completamente abandonados nos países ocidentais a partir de 1940 devido ao desenvolvimento da tecnologia de fermentação submersa impulsionada pela necessidade de produção de antibióticos em grande escala (PANDEY, 2003).

A FES é definida como a fermentação envolvendo o crescimento de microrganismos em materiais sólidos úmidos, na ausência de água livre (PANDEY, 1992). No entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para sustentar o crescimento e metabolismo do microrganismo. Esta água encontra-se disponível na forma complexada ou absorvida na matriz sólida (PANDEY, 2003; RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

Os principais microrganismos cultivados em meio sólido são os fungos filamentosos. Os meios sólidos se assemelham ao ambiente natural (solos, troncos, etc.) de desenvolvimento desses fungos. As condições de cultivo da FES são, portanto, mais semelhantes aos seus *habitats* naturais se comparadas às da FS, de modo que estes são capazes de crescer e excretar grandes quantidades de enzimas (CASTILHO *et al.*, 2000a).

Devido à ausência de água livre, a produção de efluentes líquidos é reduzida. A baixa atividade de água também ajuda a prevenir contaminações, possibilitando que

alguns processos sejam conduzidos sem necessidade de esterilização (HÖLKER e LENZ, 2005) e com conseqüente menor demanda energética. Adicionalmente, a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono para o processo de fermentação no estado sólido caracteriza mais uma vantagem do ponto de vista ambiental.

A tecnologia de produção de enzimas por FES com fungos filamentosos, sobretudo a partir de rejeitos, apresenta ainda vantagens sobre o aspecto econômico. A grande vantagem econômica do processo da FES em comparação com a FS se deve ao uso de matérias-primas de baixo custo, sendo de especial interesse para países com abundância de resíduos agroindustriais (CASTILHO *et al.*, 2000b).

Em alguns casos, o produto final de fermentação pode ser diretamente utilizado para sua aplicação final, sem necessidade de posteriores etapas de recuperação e purificação. Em outros casos, ao menos a extração pode ser facilitada devido à alta concentração de produtos (SPIER, 2005).

Com relação à produção de enzimas, VINIEGRA-GONZALEZ *et al.* (2003) compararam o desempenho de *Aspergillus niger* na produção de invertases, pectinases e tanases por FES e FS. O processo de FES mostrou-se mais vantajoso para a produção dessas enzimas. As principais justificativas propostas foram: as maiores massas de células obtidas, ocasionando maiores produtividades; menor repressão catabólica e maior conversão das enzimas de interesse acompanhada por menor ação proteolítica.

Dentre as desvantagens da FES em relação à FS, os principais obstáculos são: as condições de fermentação heterogêneas; dificuldade de aumento de escala (*scale-up*); risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade em fermentações mais longas e/ou em maiores escalas) e dificuldade de controle em linha das variáveis do processo fermentativo, como pH, biomassa e umidade (PANDEY, 2003; SANTOS *et al.*, 2004; HÖLKER e LENZ, 2005; SPIER, 2005).

Dentre as principais tecnologias para produção de enzimas, a FES apresenta diversas vantagens já descritas, além de agregar menores custos operacionais à planta e apresentar a capacidade única de produzir um complexo enzimático completo para

degradar o amido na forma granular. Para o fungo filamentosos crescer sobre a matriz sólida e metabolizar os nutrientes presentes na mesma, faz-se necessário que este produza um conjunto de enzimas capazes de atuar sobre a matéria-prima. Desta forma, a FES foi o processo adotado para a produção das enzimas no presente trabalho, tendo como objetivo a obtenção de um complexo rico em diferentes amilases e diferentes enzimas acessórias.

Como comentado anteriormente, de forma geral, os fungos filamentosos são os que apresentam melhor crescimento em meios sólidos, na ausência de água livre. Isto se deve provavelmente à sua estrutura de crescimento, em hifas. Os micélios fúngicos penetram nas partículas sólidas (fonte de carbono), enquanto a água absorvida nas mesmas é utilizada pelos microrganismos para crescimento e atividade metabólica (PANDEY, 1992).

PANDEY (1992) cita a importância da umidade em cada processo, tendo em vista que uma alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato, dificultando a transferência de oxigênio e facilitando a contaminação por bactérias. Por outro lado, baixos níveis de umidade levam a um fraco crescimento e menor acessibilidade aos nutrientes.

Assim, são importantes critérios quando se trata de FES visando à produção de enzimas a seleção do microrganismo e da matéria-prima mais adequados, bem como a adoção de teores de umidade e temperaturas apropriados (PANDEY, 1992).

A produção de enzimas amilolíticas geralmente é induzida pela presença de amido ou maltose, enquanto a glicose e outros açúcares como xilose e frutose podem reprimir a sua produção (GUPTA *et al.*, 2003). Portanto, as fontes de carbono amiláceas são os principais substratos para a produção de amilases por FES.

Especificamente visando à produção de amilases por FES, CASTRO *et al.* (2010b) avaliaram oito linhagens de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Dentre as cepas utilizadas, a linhagem de *A. awamori* IOC-3914 apresentou maior produção de endo e exoamilase.

CASTRO *et al.* (2010b) investigaram quatro diferentes matérias-primas (tortas de amido provenientes da extração de óleo de babaçu, canola, mamona e girassol),

para a produção de amilases e enzimas acessórias, por fungos filamentosos, utilizando FES. Segundo os autores, a torta de babaçu foi a matéria-prima mais adequada para a produção de amilases e proteases.

3.3 O etanol

3.3.1 História

O etanol, também conhecido como álcool etílico (C_2H_6O), é produzido desde os tempos antigos pela fermentação de açúcares presentes em produtos vegetais, tais como cereais, beterraba, batata e cana, sendo a fabricação de bebidas alcoólicas, na verdade, tão antiga quanto a civilização humana. A produção de etanol puro começa no século XII, juntamente com melhorias na “arte da destilação”. Durante a Idade Média, o álcool foi usado principalmente para a elaboração de medicamentos e para a fabricação de pigmentos (ROEHR, 2001).

No início do século XX, tornou-se conhecido o potencial do álcool para ser utilizado como combustível para diferentes motores de combustão, especialmente em automóveis, o que levou ao desenvolvimento de vários métodos para produção de etanol em larga escala.

Os primeiros protótipos de motores de combustão interna, construídos no século XIX por Samuel Morey em 1826 e Otto Nicholas em 1876, eram capazes de usar o etanol como combustível. O primeiro carro produzido por Henry Ford, em 1896, poderia usar etanol puro como combustível e, em 1908, o Ford Modelo T, o primeiro carro fabricado em série, era um veículo flexível, que poderia ser ajustado para usar o etanol como combustível da mesma forma que a gasolina ou qualquer mistura dos dois (SOLOMON *et al.*, 2007). O etanol foi amplamente utilizado como combustível na Europa e nos Estados Unidos a partir do início do século XX.

A necessidade de combustível durante a Primeira Guerra Mundial aumentou a demanda por etanol nos EUA. Após a guerra houve uma diminuição na demanda, pois se tornou mais caro produzir etanol do que combustíveis à base de petróleo. Entretanto, houve interesse (da *Ford Motor Company*, da *General Motors Corporation* e da *DuPont*, por exemplo) em etanol tanto como um agente antidetonante (maior

octanagem), quanto como um possível substituto para o combustível derivado de petróleo (SOLOMON *et al.*, 2007; MUSSATTO *et al.*, 2010). Contudo, após a II Guerra Mundial, a maioria das plantas de produção de etanol foi desmantelada, devido principalmente a intervenções da indústria do petróleo dos EUA (ROEHR, 2001).

3.3.1.1 O renascimento do etanol

O panorama mundial mudou drasticamente quando, em outubro de 1973, teve início a Guerra de *Yom Kippur*, um conflito entre árabes e israelenses, que, entre suas consequências, levou ao primeiro choque do petróleo, devido à retaliação dos países árabes da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) frente ao apoio norte-americano a Israel.

O motivo da guerra teria sido uma tentativa de recuperação dos territórios (Colinas de Golã, Sinai e Cisjordânia) perdidos para Israel durante a Guerra dos Seis Dias em 1967, bem como chamar a atenção do Ocidente para a situação dos povos árabes.

Com o fim da guerra restava ao resto do mundo adaptar-se, pois o custo do barril de petróleo aumentara 300 %. Foi um marco na história do século XX e teve um papel central para a detonação de um colapso econômico mundial. A partir desse momento, o mundo passou a refletir sobre a questão energética e medidas foram adotadas por diversos países para conter a dependência da importação do petróleo (PEREIRA, 2008).

Esta mudança reacendeu o interesse mundial por outras fontes de energia e levou diversos países a buscarem soluções mais adequadas, considerando as peculiaridades nacionais (BERTELLI, 2007). Desta forma, o mercado de etanol combustível ganhou uma nova força.

3.3.2 O combustível

O etanol é um combustível líquido derivado, principalmente, de biomassa renovável. Contudo, apresenta algumas diferenças importantes em relação aos combustíveis derivados de petróleo (BNDES, 2008). A principal delas é o elevado teor de oxigênio, que constitui cerca de 35 % em massa do etanol. As características do

etanol possibilitam uma combustão mais limpa e um melhor desempenho dos motores, atuando como aditivo capaz de melhorar a qualidade antidetonante da gasolina (maior octanagem) e reduzir as emissões de poluentes, substituindo aditivos promotores de octanagem que possuem restrição ambiental, como o chumbo tetraetila e o MTBE, que vêm tendo seu uso banido em muitos países (BNDES, 2008).

O etanol pode ser utilizado como combustível em motores de combustão interna com ignição por centelha (ciclo Otto) de duas formas: anidro, em mistura com a gasolina; ou hidratado, comercializado via bombas específicas nos postos de abastecimento, em veículos movidos exclusivamente a etanol e em veículos bicomcombustível, também conhecidos como *flex fuel* (BNDES, 2008). Segundo a legislação brasileira, considerando teores em volume a 20°C, o etanol anidro deve conter menos de 0,48 % de água, enquanto, para o etanol hidratado, esse teor deve estar entre 4,02 % e 4,87 % (BNDES, 2008).

O uso do etanol hidratado não apenas em carros movidos exclusivamente a álcool, mas também em veículos *flex fuel*, gerou um aumento significativo no consumo deste combustível. No Brasil, os veículos *flex fuel* aceitam uma mistura em qualquer proporção entre gasolina C (etanol anidro misturada à gasolina) e etanol hidratado. Nos Estados Unidos, veículos especialmente projetados utilizam um combustível misturado E85, com até 85 % em volume de etanol anidro e, pelo menos, 15 % de gasolina, para garantir a partida a frio do carro (SZKLO, 2007). Tais veículos também são *flex*, pois são projetados para funcionar com qualquer mistura de gasolina e etanol, desde que o etanol não ultrapasse 85 % em volume.

Em muitos países o uso do etanol anidro como aditivo à gasolina, em uma mistura com 10 % (v/v) (a chamada mistura E10), tem sido estimulado. Neste caso, não se deve tratá-lo como um substituto à gasolina, mas, sobretudo, como um bem complementar (SZKLO, 2007).

O etanol, nos dias de hoje, é o principal biocombustível utilizado no mundo e o seu uso é cada vez mais difundido, com perspectivas de expansão da produção e do consumo de etanol em todo o mundo (BASTOS, 2007).

3.3.3 Panorama mundial

Muitos apontam o Brasil como o país que mais reúne vantagens competitivas para liderar a agricultura de energia, com o maior potencial de crescimento na produção de energia renovável, como o etanol e o biodiesel, devido: à disponibilidade de terras agriculturáveis; à posição geográfica privilegiada, com clima favorável à agricultura; e à grande competitividade internacional que o setor sucroalcooleiro brasileiro apresenta, tanto na produção de açúcar, como na de álcool.

O Brasil tinha um programa pioneiro para produzir álcool para automóveis desde a década de 1920 e foi o líder mundial na produção de etanol combustível por mais de 30 anos, ou seja, possuía (e ainda possui) o *know-how* da produção e da comercialização. Entretanto, em 2005 os Estados Unidos ultrapassaram o Brasil, assumindo o posto de maior produtor mundial.

O avanço da demanda por etanol nos EUA ocorreu no início da década de 1990, com a emenda do *Clean Air Act*, que estabeleceu um conjunto de padrões de qualidade do ar nos EUA. Para reduzir o nível de poluição, foram instituídos programas para a adição de oxigênio na gasolina, com o uso de aditivos como o metil terc-butil éter (MTBE) ou o etanol (BOTHAST e SCHLICHER, 2005; FIGUEIRA e BURNQUIST, 2006). Para atender esta exigência de ao menos 2 % (em peso) de oxigênio, o MTBE deveria ser misturado à gasolina em proporção superior a 11 % em volume (EPA, 2007).

Entretanto, alguns anos depois, foi detectado MTBE no abastecimento de água de alguns estados dos EUA. A contaminação da água por MTBE pode ocorrer por vazamentos em dutos ou tanques de armazenamento. A descoberta deste contaminante em águas subterrâneas e as preocupações com a qualidade da água desencadearam um debate sobre o uso do MTBE na gasolina (EPA, 2007). Além das questões ambientais, que vêm forçando a substituição do MTBE pelo etanol, o *lobby* dos produtores de milho americanos e a estratégia para reduzir a dependência por importação de petróleo, também desempenharam um papel relevante (FIGUEIRA e BURNQUIST, 2006). Assim, impulsionado pelo banimento do MTBE em diversos estados norte-americanos e pela oportunidade de estimular o desenvolvimento rural, o crescimento da indústria do etanol acelerou-se ainda mais.

Nos Estados Unidos existem diversos incentivos ao uso do etanol concedidos pelo governo federal e pelos governos estaduais, tais como: isenções de impostos federais para combustíveis que contenham 10 % de etanol; crédito fiscal adicional para pequenos produtores de etanol e dedução em impostos para veículos movidos a álcool (BASTOS, 2007). Além dos programas prevendo uma mistura minoritária do álcool na gasolina, existem, também, os já mencionados programas nos quais o etanol é o principal combustível veicular (E85).

Nos Estados Unidos existem, atualmente, mais de 200 instalações de produção de etanol em operação, além de outras em construção ou em fase de planejamento (Figura 3.6). O etanol é produzido, principalmente, a partir do milho e a sua importância para a indústria de milho é muito significativa. A Figura 3.6 mostra, ainda, que grande parte da estrutura produtiva já consolidada, bem como os novos investimentos, está localizada na região conhecida como cinturão do milho (*corn belt*).



Figura 3.6: Localização das unidades de produção de etanol nos EUA. **Fonte:** Adaptado de RFA (2011).

Ao longo dos últimos dez anos, a produção de etanol no mundo tem aumentado drasticamente. Entre 2000 e 2009, a produção mundial de etanol combustível cresceu de 16,9 bilhões de litros para mais de 74 bilhões de litros (RFA, 2010), com destaque para Estados Unidos e Brasil, que, juntos, detêm 86 % da produção mundial, seguidos pela União Européia e pela China (Figura 3.7).

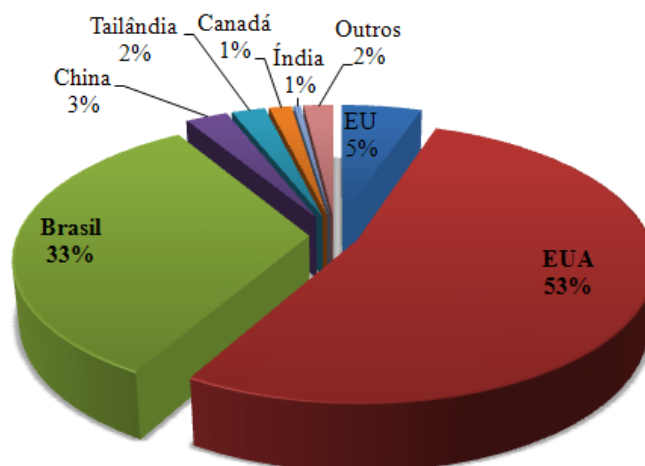


Figura 3.7: Distribuição da produção mundial de etanol em 2009. **Fonte:** Adaptado de F.O. Licht *apud* RFA (2010).

Na União Europeia a indústria de etanol ainda é pequena e incipiente, porém tem apresentado um expressivo crescimento. A produção de etanol na região subiu de 1,6 bilhão de litros, em 2006, para cerca de 3,9 bilhões de litros, em 2009 (RFA, 2010), sendo Alemanha e França os dois maiores produtores de etanol na União Europeia.

Na Alemanha a produção de etanol está baseada em açúcar de beterraba e grãos de cereais, enquanto na França o etanol é obtido a partir de milho, trigo e beterraba (SORDA *et al.*, 2010). Esses dois países representam cerca de 50 % da produção de toda União Europeia.

No Canadá a produção de etanol é quase exclusivamente baseada em grãos de cereais. Em 2009, o milho era a matéria-prima usada em 69 % da produção de etanol, enquanto o trigo contribuía com outros 30 % (SORDA *et al.*, 2010).

A China possui plantas industriais de etanol com o uso de grãos (milho, arroz e trigo) e tubérculos (mandioca). Em 2010, foram produzidos 1,95 bilhão de litros a partir de milho (aproximadamente 80 %), trigo e arroz, além de uma produção de etanol de mandioca estimada em 177,4 milhões de litros por ano (USDA, 2011).

3.3.4 A história do álcool no Brasil

O Brasil ocupa posição destacada na produção mundial de etanol, muito devido à sua tradição na cultura de cana-de-açúcar. A cana é uma das principais culturas

mundiais, cultivada em mais de cem países, principalmente nas nações em desenvolvimento, embora cerca de três quartos da produção mundial esteja concentrada em oito países. O Brasil é o maior produtor mundial, seguido por Índia, China, Tailândia e Paquistão (BASTOS, 2007).

Com a crise internacional de 1973, o Brasil elevou muito seus gastos com importação de petróleo, provocando um déficit na balança comercial de US\$ 4,7 bilhões, o que impactou fortemente na dívida externa brasileira e no aumento da inflação (BERTELLI, 2007).

Neste mesmo período, o setor açucareiro registrava elevada capacidade ociosa, que poderia ser reduzida com a produção de álcool combustível, o que proporcionaria maior flexibilidade da produção de açúcar para exportação (BERTELLI, 2007).

Com a elevação dos preços do petróleo somada ao risco de superprodução do açúcar, fez-se necessário adotar medidas a fim de resolver tanto a crise do petróleo quanto a do açúcar. Desta forma o governo federal instituiu o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), mediante o Decreto 76.593 de 14/11/1975, firmado pelo então presidente Ernesto Geisel (BNDES, 2008).

Assim, com uma intervenção governamental substancial para aumentar a oferta e a demanda por etanol, o Brasil desenvolveu capacidades institucionais e tecnológicas para o uso de energia renovável em larga escala (MUSSATTO *et al.*, 2010). Considerações econômicas da indústria do açúcar pesaram no estabelecimento deste programa, porém preocupações de caráter ambiental e social não tiveram um papel significativo na ocasião (BNDES, 2008).

No período de 1973 a 1985, a produção saltou de 660 milhões de litros por ano para 11,9 bilhões de litros, para abastecer a nova frota de mais de 2,4 milhões de automóveis projetados para utilização de álcool hidratado e também para a sua mistura na gasolina na forma de álcool anidro, com mais 6,3 milhões de automóveis a gasolina novos em circulação (SANTANA, 2007; MAPA, 2010).

Até o final dos anos 80, os veículos movidos exclusivamente a álcool hidratado representavam 85 % dos veículos novos na frota nacional. No entanto, nessa época, problemas de logística no abastecimento, redução dos preços do petróleo e aumento

da cotação internacional do açúcar tornaram o etanol pouco competitivo, o que levou à estagnação do Proálcool. Nos anos 1990, ocorreu, ainda, a desregulamentação estatal dos mercados de açúcar e álcool no país, o que aumentou a incerteza sobre o uso do etanol como combustível (GOLDEMBERG *et al.*, 2008).

A extinção dos subsídios à produção do etanol não significou a completa eliminação da intervenção estatal, uma vez que o governo continuou a encorajar a indústria e manteve a obrigatoriedade da adição de etanol à gasolina (ampliada de 20 % para 25 % em 1993) (BASTOS, 2007). Atualmente, o Poder Executivo, através da Lei nº 12.490 em 19/09/11, fixa o percentual da mistura de álcool anidro na gasolina no intervalo entre 18 % e 25 % (MDIC, 2011).

A produção de etanol combustível em larga escala no Brasil trouxe a necessidade de um grande desenvolvimento tecnológico para o setor agroindustrial da cana. Ainda, para superar os baixos preços no mercado e os custos de produção, as indústrias sucroalcooleiras melhoraram seus processos de fermentação (AMORIM *et al.*, 2011). Novas tecnologias foram desenvolvidas e transferidas para a indústria, tais como: melhoria nos sistemas de moagem e destilação; ganhos de produtividade na fermentação; aumento da produtividade agrícola; obtenção de maior eficiência de conversão; entre outras (GOLDEMBERG *et al.*, 2008). Para muitos produtos e serviços os custos unitários diminuem com o aumento da experiência, sendo este efeito muitas vezes referido como curva de aprendizagem (*learning curve*). Em consequência do desenvolvimento e incorporação dessas tecnologias, a curva de aprendizado brasileira apresenta uma progressiva redução dos custos, devido, principalmente, ao aumento da eficiência industrial com crescente evolução da produtividade (GOLDEMBERG *et al.*, 2004). Houve, ainda, redução dos impactos ambientais provocados por essas usinas (AMORIM *et al.*, 2011).

3.3.4.1 Uma nova fase

Em 2003, um fato marcou o surgimento de um novo impulso para o setor sucroalcooleiro: a introdução dos veículos bicomcombustíveis (*flex fuel*) no mercado brasileiro, que deu início a uma nova onda de dinamismo no país. Promovidos por

incentivos fiscais e combinados com os elevados preços do petróleo, os veículos bicompostíveis levaram ao rápido crescimento na produção de etanol de cana.

A Figura 3.8 mostra a evolução ao longo dos anos da produção de veículos leves (automóveis de passeio e veículos comerciais leves) movidos a diesel, gasolina, etanol (álcool) e *flex fuel*. No intervalo de 2003 a 2010, tem-se a redução dos veículos a gasolina, a extinção das vendas de veículos exclusivos a etanol e valores praticamente constantes de veículos a diesel. Pode-se observar ainda um expressivo aumento na produção de veículos *flex*. Esses veículos representaram em 2010 mais de 86 % das vendas nacionais de carros novos e, desta forma, o consumo de etanol hidratado subiu consideravelmente nos últimos anos. Houve também maior consumo de etanol anidro, embora inferior ao hidratado, aumentando assim a proporção de etanol hidratado frete ao anidro. Ao todo, alcançou-se a marca de 14,6 milhões de veículos *flex* licenciados desde 2003 (ANFAVEA, 2011).

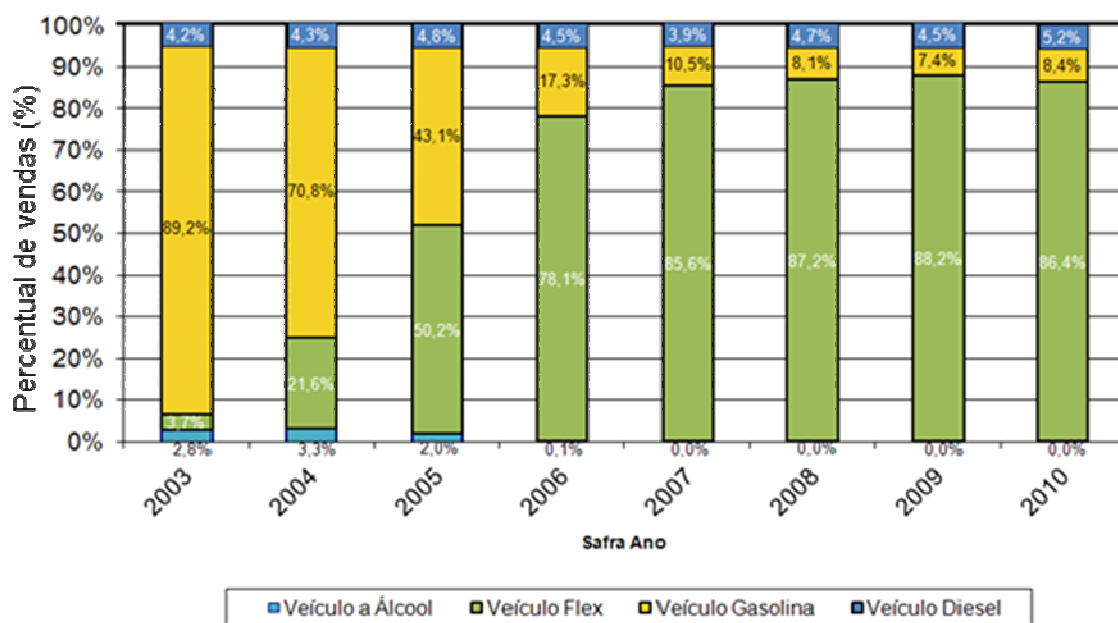


Figura 3.8: Participação de veículos leves por tipo de combustível nas vendas internas. **Fonte:** Adaptado de ANFAVEA (2011).

O Brasil proporcionou a criação de uma infraestrutura nacional de produção e distribuição, que o tornou o maior exportador mundial de etanol, atingindo a marca de 3,3 bilhões de litros de etanol exportados em 2009. O Brasil exporta para países como EUA, Japão, Jamaica, Nigéria, Coréia do Sul, Suécia, Holanda, Costa Rica, El Salvador e

México. Os EUA são grandes importadores de etanol brasileiro (313 milhões de litros importados diretamente em 2010), apesar do nível elevado de imposto de importação praticado (o etanol importado pelos EUA é tributado com a alíquota específica de US\$ 0,14 por litro e a alíquota *ad valorem* de 2,5 %) (SECEX, 2011). Entretanto, os subsídios norte-americanos para a indústria do etanol e a tarifa contra sua importação, que custavam cerca de US\$ 6 bilhões anuais, aprofundando o déficit orçamentário, expiraram no dia 31 de dezembro de 2011. Desde 1º de janeiro de 2012, os Estados Unidos deixaram de cobrar a tarifa de importação sobre o etanol, pondo fim a mais de 30 anos de protecionismo governamental, o que pode representar um maior acesso do etanol brasileiro ao mercado norte-americano.

Com base nas informações expostas sobre a produção de etanol combustível no Brasil, pode-se compreender as oscilações e mudanças na evolução de sua produção ao longo dos últimos anos (Figura 3.9).

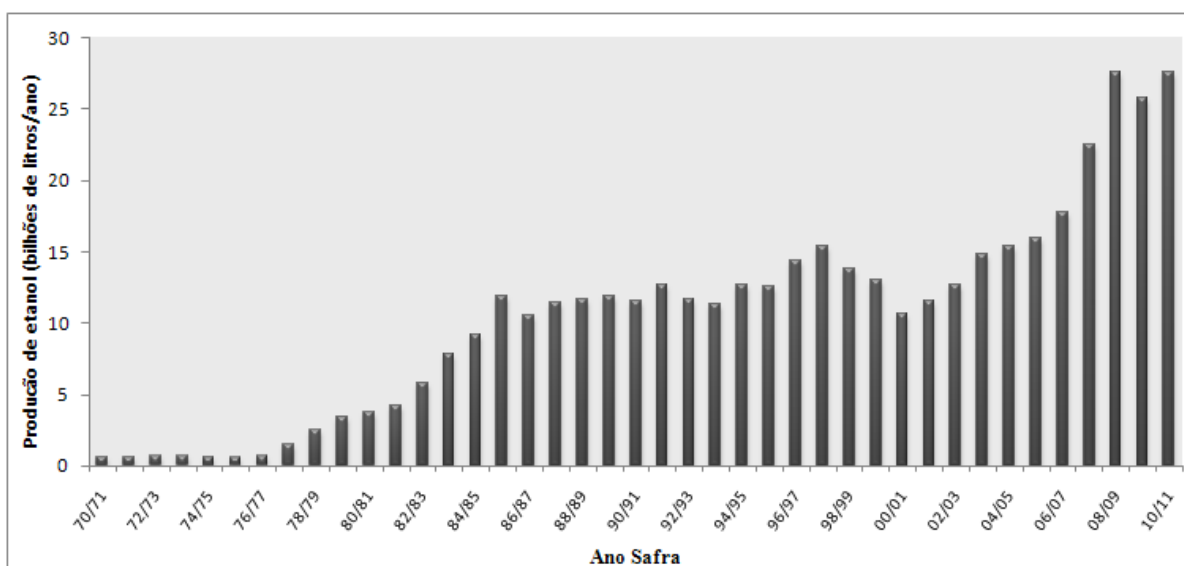


Figura 3.9: Evolução da produção de etanol no Brasil. **Fonte:** Elaborado a partir de dados MAPA (2010) e UNICA (2011).

Da Figura 3.9, pode-se perceber o significativo aumento na produção de etanol no final da década de 1970 e início da década de 1980, impulsionado pelo Proálcool, bem como uma queda no final dos anos 1990 e a nova fase iniciada em 2003, com os carros *flex*, chegando a mais de 25 bilhões de litros produzidos na safra 2008/2009. Entretanto, a tendência que havia nos últimos anos não foi seguida em 2010 e 2011, observando-se, inclusive, uma diminuição na produção nacional de 2009 para 2010.

Essa queda provocou uma forte diminuição nas exportações e levou a aumento das importações (mais de 600 milhões de litros em 2011) (SECEX, 2011).

3.3.4.2 A situação atual

O cenário recente do etanol no Brasil apresenta dificuldades de abastecimento do combustível, aumento dos preços e necessidade de importação do produto. Em média, o preço do etanol hidratado alcançou valores 40 % superiores ao mesmo período de 2010. Como o preço do álcool anidro, que é misturado à gasolina, também aumentou nesse mesmo período, o preço da gasolina foi impactado, aumentando em torno de 15 % (LOSEKANN, 2011).

Em função dessa dinâmica de preços, pela primeira vez desde 2003, quando os veículos *flex fuel* foram introduzidos, o consumo de álcool hidratado se reduziu em 2010 (queda de 8 % em relação a 2009). Como consequência, a demanda de gasolina, que ganhou competitividade em relação ao etanol, teve incremento de 17 % em 2010 (LOSEKANN, 2011).

Vários fatores contribuíram para esta modificação significativa de cenário, especialmente o desequilíbrio criado entre oferta e demanda. Houve um aumento significativo da demanda por etanol, impulsionada pelo setor automotivo com os carros *flex*, enquanto, por outro lado, a oferta de etanol foi bastante afetada pela crise financeira mundial. Tal desequilíbrio foi, ainda, agravado por algumas questões, tais como: elevação do preço do açúcar no mercado internacional, com consequente aumento da destinação da cana para a produção de açúcar, e condições climáticas não favoráveis, que acarretaram problemas nas últimas safras de cana-de-açúcar (ALMEIDA e VIEGAS, 2011).

Analisando, portanto, a atual conjuntura do mercado nacional de etanol combustível, fica notória a necessidade de processos alternativos que busquem diminuir a dependência da produção nacional de etanol em relação à cana-de-açúcar, para evitar que se tenha toda uma matriz energética concentrada em apenas um cultivo.

3.3.5 A fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica ocorre no interior de microrganismos capazes de converter açúcares assimiláveis (substrato oxidado) em etanol (substrato reduzido), através de uma série de reações bioquímicas, reguladas enzimaticamente. A oxidação parcial do substrato, gerando um composto orgânico reduzido, garante um mínimo de produção de energia para manutenção celular e o equilíbrio oxidativo.

Historicamente, os microrganismos mais comumente utilizados na fermentação alcoólica têm sido as leveduras do gênero *Saccharomyces* e, dentre essas, *Saccharomyces cerevisiae* a principal espécie. Leveduras do gênero *Saccharomyces* também são consideradas como GRAS (*generally recognized as safe*), podendo ser usadas como aditivo em alimentos para consumo humano e, portanto, ideal para a produção de bebidas alcoólicas e fermento de pão. No entanto, outras leveduras possuem a capacidade de produzir etanol, bem como algumas espécies de bactérias, como, por exemplo, *Zymomonas mobilis*.

Entre os açúcares fermentescíveis pelas leveduras estão os monossacarídeos glicose, frutose, manose e galactose, bem como os dissacarídeos maltose e sacarose e os trissacarídeos rafinose e maltotriose (dependendo da cepa). Polissacarídeos como amido e celulose não são metabolizados por leveduras (RUSSELL, 2003). Entretanto, com o uso de ferramentas de biologia molecular, faz-se possível a construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de crescer com o amido como principal fonte de carbono, através da introdução de genes de amilases. Diversas linhagens recombinantes de *Saccharomyces* para a produção de etanol foram estudadas e desenvolvidas (ASHIKARI *et al.*, 1986; MORAES *et al.*, 1995; SHIGECHI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2011). Os trabalhos visam construir cepas de leveduras capazes de degradar e hidrolisar o amido e, para tal, buscam inserir genes para produzir enzimas amilolíticas, como α -amilase e glucoamilase.

A principal via metabólica envolvida na produção do etanol em leveduras é a via glicolítica (Embden-Meyerhof): uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula (Figura 3.10) (BAI *et al.*, 2008).

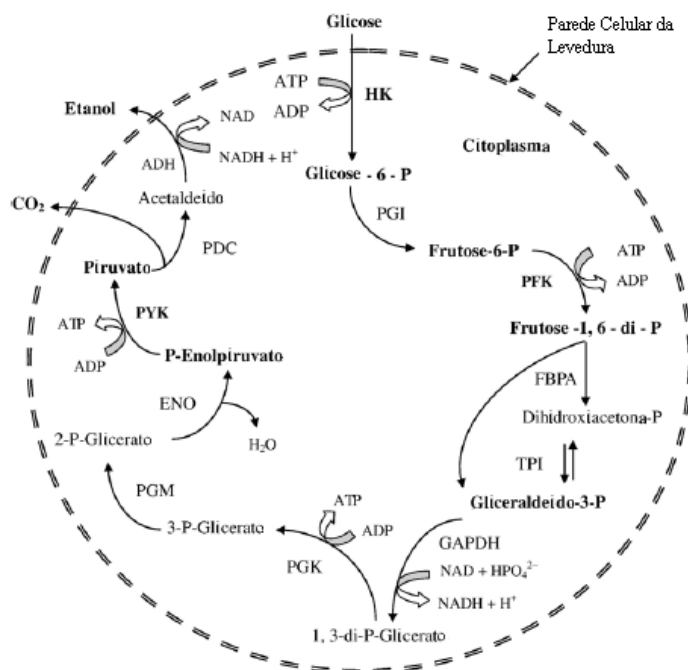
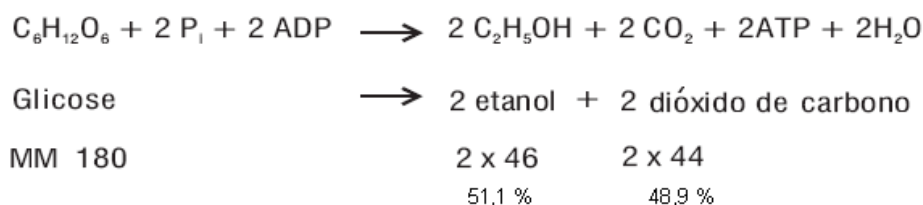


Figura 3.10: Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*. Abreviações: HK: enzima hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato quinase, PGM: fosfoglicomutase, ENO: enolase, Pyk: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, e ADH: álcool desidrogenase. **Fonte:** BAI *et al.* (2008).

As leveduras são consideradas anaeróbios facultativos, ou seja, são capazes de crescer na presença ou na sua ausência de oxigênio. Quando o oxigênio é suficiente e a concentração de substrato é baixa, pouco ou nenhum etanol é produzido e a levedura segue a fosforilação oxidativa (respiração aeróbia), com o oxigênio como aceptor final de elétrons. Os açúcares são utilizados para produção de energia e crescimento celular. Entretanto, quando há a ausência de oxigênio (anaerobiose) ou alta concentração de glicose, o etanol é o principal produto final.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode, portanto, alternar de respiração para fermentação alcoólica. Em condições anaeróbias, este último é o único modo de produção de energia. No entanto, a fermentação alcoólica pode ocorrer mesmo na presença de oxigênio, conforme o efeito denominado *Crabtree* (CRABTREE, 1928), se a concentração de glicose ultrapassa um valor limite crítico (que depende do microrganismo e da cepa de levedura) (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986), devido à inibição da síntese de enzimas respiratórias.

Desta forma, em condições anaeróbias ou em elevada concentração de glicose, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de dióxido de carbono. Teoricamente, pode ser obtido até 51,1 % de etanol e 48,9 % de CO₂ em base mássica, em relação à glicose metabolizada, e, ainda, são produzidos na glicólise dois moles de ATP (adenosina tri-fosfato) por mol de glicose, usados para a manutenção energética das células, conforme ilustrado de forma resumida a seguir:



Esta equação química, nomeada em homenagem ao cientista francês Gay-Lussac, mostra que a glicose produz partes aproximadamente iguais de dióxido de carbono e etanol e ainda libera energia. Parte da energia é usada para o metabolismo celular e parte é perdida na forma de calor. Esta relação, porém, ignora que parte da glicose será destinada para o crescimento da levedura e que existem outros metabólitos produzidos (RUSSELL, 2003).

Os subprodutos, tais como glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores, são produzidos em pequena quantidade em relação à quantidade de etanol. A produção destes subprodutos, bem como o crescimento e manutenção celular, inevitavelmente, direciona intermediários da via glicolítica para as vias metabólicas correspondentes, diminuindo a produção de etanol. Na indústria, a eficiência de conversão em etanol, calculada tendo como referência o rendimento de 51,1%, chega a 90-93 %, devido, principalmente, ao crescimento celular e à produção de produtos finais de metabolismo secundário (INGLEDEW, 1999).

A produção de glicerol por fermentação de levedura é conhecida desde as investigações de Pasteur em 1858. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica, com o papel de manter o balanço redox citossólico da célula, especialmente em condições anaeróbias, compensando reações celulares que produzem NADH (VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986).

O glicerol atua, ainda, na pressão osmótica do meio e seu acúmulo é muito importante para a sobrevivência durante o estresse osmótico. O aumento da temperatura, entre outros estresses, faz com que a célula de levedura produza maiores quantidades de glicerol. Industrialmente, em uma fermentação de etanol combustível, os níveis de glicerol podem chegar a 15 g/L (RUSSELL, 2003).

Entre os ácidos orgânicos, o ácido succínico é o principal produto secundário final da fermentação alcoólica. Os ácidos pirúvico, málico, fumárico, oxaloacético, cítrico, α -cetoglutárico, glutâmico, propiônico, láctico e acético também são produzidos durante a fermentação alcoólica, mas em quantidades ainda menores. Alguns destes ácidos orgânicos são acumulados devido às enzimas que atuam através da operação limitada do ciclo do ácido cítrico. Em bebidas fermentadas, muitos destes ácidos podem afetar o sabor, podendo, ainda, ser convertidos em ésteres (INGLEDEW, 1999).

3.3.5.1 As leveduras

Os requisitos específicos para o crescimento de leveduras incluem (RUSSELL, 2003): (i) água; (ii) uma fonte de carbono – carboidratos fermentescíveis como fonte de energia; (iii) oxigênio; (iv) fonte de nitrogênio; (v) fatores de crescimento, como vitaminas, e (vi) íons inorgânicos – essenciais para o metabolismo celular. O oxigênio, em quantidades pequenas, é exigido por leveduras *Saccharomyces* para a síntese de esteróis e ácidos graxos insaturados, ambos críticos para a função e integridade das membranas das células de levedura (INGLEDEW, 1999).

A absorção de nitrogênio é necessária para a síntese de proteínas e outros componentes nitrogenados da célula, mas as leveduras só podem utilizar compostos nitrogenados de baixa massa molar, como íons amônio inorgânicos, uréia, aminoácidos e pequenos peptídeos. As leveduras não podem quebrar e metabolizar proteínas ou peptídeos maiores que tripeptídeos (INGLEDEW, 1999).

Com relação às outras fontes nutricionais, as vitaminas, tais como biotina, riboflavina, niacina, tiamina, entre outras, são importantes reguladores e cofatores de diversos processos metabólicos. Entre os íons inorgânicos que atendem a demanda pelos macro e micronutrientes necessários para o crescimento de leveduras, estão o

fósforo e o enxofre, além de importantes cátions, como zinco, manganês, magnésio, cálcio, cobre, potássio e ferro.

As leveduras são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura (entre 5°C e 43°C). Algumas cepas comerciais alcooleiras apresentam boa capacidade de fermentação em temperaturas da ordem de 32-35°C. Em altas temperaturas a atividade metabólica diminui rapidamente. As leveduras preferem um pH ácido e seu pH ideal é 5,0-5,2, mas cepas de cervejaria e alcooleiras são capazes de apresentar um bom crescimento na faixa de pH de aproximadamente 3,5 a 6,0 (RUSSELL, 2003).

Quando uma levedura é transferida para um meio adequado, sob condições de crescimento ideais, a curva de crescimento pode ser ilustrada conforme a Figura 3.11.

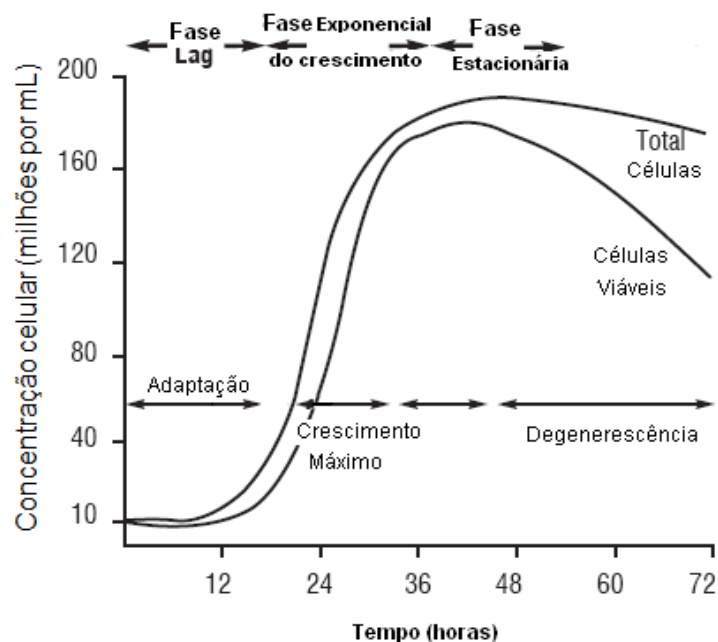


Figura 3.11: Curva típica de crescimento de levedura. **Fonte:** RUSSELL (2003).

A propagação das células pode ocorrer em múltiplos estágios, com a presença de açúcares fermentescíveis, como a glicose, ou fontes mais econômicas como caldo de cana-de-açúcar e melaço, e outras fontes adicionais de nutrientes. Nesta etapa, é importante que sejam mantidas condições altamente aeróbicas, para o aumento da concentração celular, e a fonte de carbono pode ser alimentada gradualmente, para evitar o efeito *Crabtree* e para maximizar o crescimento respiratório. Este cultivo deve então ser usado como inóculo para o meio de fermentação, preferencialmente na fase

de crescimento exponencial, quando as células estão aclimatadas e há a maior taxa de crescimento celular. O tanque de propagação de inóculo recomendado é de 7-10 % do tamanho do fermentador e objetiva-se geralmente chegar a cerca de 300 milhões de células/mL (INGLEDEW, 1999; RUSSELL, 2003).

3.3.6 Processos convencionais de produção de etanol

O etanol pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas. De forma geral, estas podem ser classificadas da seguinte forma (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007):

- **Matérias-primas sacaríneas:** são materiais contendo sacarose e contemplam açúcares que podem ser diretamente consumidos, presentes na cana-de-açúcar, beterraba, melão e frutas;
- **Matérias-primas amiláceas:** materiais ricos em amido, em que o polissacarídeo deve primeiro ser hidrolisado para gerar açúcares fermentescíveis;
- **Matérias-primas lignocelulósicas:** nas biomassas lignocelulósicas (de madeira, palha, bagaço de cana, resíduos de fábricas de papel, etc.) o açúcar disponível se encontra na forma de celulose. Também podem ser convertidas em etanol, através de diferentes tratamentos que tornam possível a hidrólise dos polissacarídeos e o acesso dos microrganismos aos monossacarídeos provenientes destes materiais.

O açúcar para produção de etanol (sacarose, maltose, glicose ou frutose) pode ser, portanto, derivado de ao menos uma das três classes de matérias-primas descritas.

Considerando que o presente trabalho teve como foco o uso de matérias-primas amiláceas para a produção de etanol, estas serão o objeto da discussão que se segue, que contempla o estado da arte da tecnologia de produção de etanol.

3.3.6.1 Etanol de milho

O etanol pode ser produzido a partir de milho por meio de dois principais processos: adotando moagem úmida (*wet mill*) ou seca (*dry grind*). A via úmida era a opção mais comum até os anos 1990, mas, hoje em dia, a via seca se consolidou como

o processo mais utilizado para a produção do etanol. Em 2006, o processo pela via seca representava 82 % das plantas em operação nos EUA (RFA, 2007).

A moagem úmida de milho é um processo desenhado para a recuperação e purificação do amido e de diversos co-produtos (gérmen, glúten, fibra, óleo de milho). Desta forma, o amido é separado dos sólidos, hidrolisado por enzimas para a liquefação e sacarificação, obtendo-se uma alta concentração de glicose, fermentada em seguida para a obtenção do etanol.

No processo por via seca, o milho limpo é moído e misturado com água para formação do mosto, que é então submetido à etapa de cozimento, a uma temperatura entre 90 e 150°C, por cerca de 20 minutos. Esta etapa visa a gelatinização de todo amido presente, de modo a tornar o polímero solúvel mais exposto à ação das enzimas na hidrólise. Em seguida, ocorre a liquefação, geralmente por um tempo de 45 a 90 minutos, mantendo-se a reação entre 80 e 90°C e com a adição de α -amilases termoestáveis em pH 6,5, sob agitação (BOTHAST e SCHLICHER, 2005; KWIATKOWSKI *et al.*, 2006). Ocorre, assim, a liquefação e a conversão do amido em oligossacarídeos. O ajuste do pH para a faixa de 6,0 a 6,5 para esta etapa pode ser realizado com adição de amônia ou óxido de cálcio (cal). O óxido de cálcio é um composto alcalino que, além do ajuste de pH, fornece íons cálcio importantes para a estabilidade da α -amilase.

Após a liquefação, o mosto é resfriado, normalmente até 60-65 °C, e são adicionadas as glucoamilases, para converter os oligossacarídeos em glicose. Um ácido, normalmente ácido sulfúrico, é usado para diminuir o pH no tanque para cerca de 4,5. A sacarificação é realizada geralmente por um tempo entre 45 e 90 minutos, mas pode chegar a 6 horas (KELSALL e LYONS, 2003).

Após a reação de sacarificação, o mosto é transferido para os fermentadores e resfriado a 30-35°C, quando se inicia a fermentação com a adição da levedura (KWIATKOWSKI *et al.*, 2006). Muitas vezes, adiciona-se sulfato de amônio ou uréia como fonte de nitrogênio para o crescimento da levedura. Recentemente, os processos de etanol de via seca também começaram a adicionar proteases que hidrolisam a proteína do milho, liberando aminoácidos que servem como uma fonte adicional de nitrogênio (INGLEDEW, 1999; WANG *et al.*, 2009a). A fermentação exige um tempo total de 48 a 72 horas e atinge uma concentração final de etanol de 10-14 %

(v/v) (BOTHAST e SCHLICHER, 2005; NICHOLS *et al.*, 2008; QUINTERO *et al.*, 2008), apresentando uma produtividade para o processo industrial em batelada de 1,8 a 2,5 g/(L·h) e para processo contínuo (CSTR) de cerca de 6 g/(L·h) (ROEHR, 2001).

A etapa de fermentação descrita trata-se de um processo SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*). No processo SHF, como as etapas de hidrólise e fermentação são realizadas separadamente, essas podem ocorrer em temperaturas e condições diferentes, mais próximas às condições ideais para cada enzima (KRISHNAN *et al.*, 2000).

Entretanto, o processo poderia ser realizado com as etapas de sacarificação e fermentação ocorrendo simultaneamente (SSF). Dentre as principais vantagens do processo SSF para produção de etanol a partir de biomassas, está a sua capacidade de converter rapidamente os açúcares em etanol, assim que eles são formados, evitando seu acúmulo no meio. Tendo em vista que os açúcares são inibitórios para o processo de hidrólise, existe o potencial para se alcançar taxas mais elevadas e maiores rendimentos, em comparação ao SHF (WYMAN *et al.*, 1992). Além disso, a presença de etanol no meio reacional também propicia uma mistura menos vulnerável à ação de microorganismos indesejáveis e permite uma diminuição do *stress* osmótico inicial para a levedura, evitando uma solução de glicose concentrada (BOTHAST e SCHLICHER, 2005). O processo SSF proporciona uma operação com menor necessidade de equipamentos do que para o processo seqüencial, uma vez que não são necessários reatores de hidrólise (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007).

Após a conclusão do processo, o meio fermentado é destilado em uma ou mais etapas em colunas de destilação. O etanol destilado pode ser então desidratado, com a utilização de peneiras moleculares, por exemplo, que retiram o restante da água presente, produzindo etanol anidro, com 99,6 % (v/v) de etanol (KWIATKOWSKI *et al.*, 2006; NICHOLS *et al.*, 2008), ou vendido na sua forma azeotrópica, com cerca de 95 % (v/v) de etanol (etanol hidratado).

A vinhaça produzida segue para um conjunto de centrífugas, aonde é separada a vinhaça fina, que pode ser recirculada no processo. A parte restante da vinhaça é geralmente concentrada em evaporadores, produzindo um xarope com cerca de 50 % de umidade, que, depois, é combinado com os sólidos retirados na centrífuga. Esses

sólidos restantes, provenientes da fermentação e da destilação, são secos até aproximadamente 10 % de umidade, para produzir o DDGS (*Dried Distiller's Grains with Solubles*) (BOTHAST e SCHLICHER, 2005). A composição do DDGS tem sido de grande interesse para a área nutricional, para os produtores de etanol e, especialmente, para a indústria de rações animais, sendo este o seu principal destino. A análise de composição do DDGS está associada a seus valores nutricionais, tais como digestibilidade, total de nutrientes digestíveis e proteína, teor calórico, perfil de aminoácidos e minerais (KIM *et al.*, 2008).

Apesar de não proporcionar grande variedade de produtos, como no caso úmido, as inúmeras melhorias realizadas no processo seco tornaram-no uma opção com custos de investimento e operacionais mais baixos, reduzindo consideravelmente o custo final do etanol (NOVOZYMES, 2000 *apud* BNDES, 2008).

Quanto aos rendimentos, segundo WYMAN (1996), as usinas de via seca produzem cerca de 460 litros de etanol anidro e 380 kg de DDGS por tonelada de milho seco. Estes valores estão de acordo com KELSALL e LYONS (2003), que reportaram valores de rendimentos de 423 litros de etanol por tonelada de milho, podendo chegar a 456 litros em destilarias que usam processo SSF. Um exemplo de fluxograma representativo do processo por via seca é apresentado na Figura 3.12.

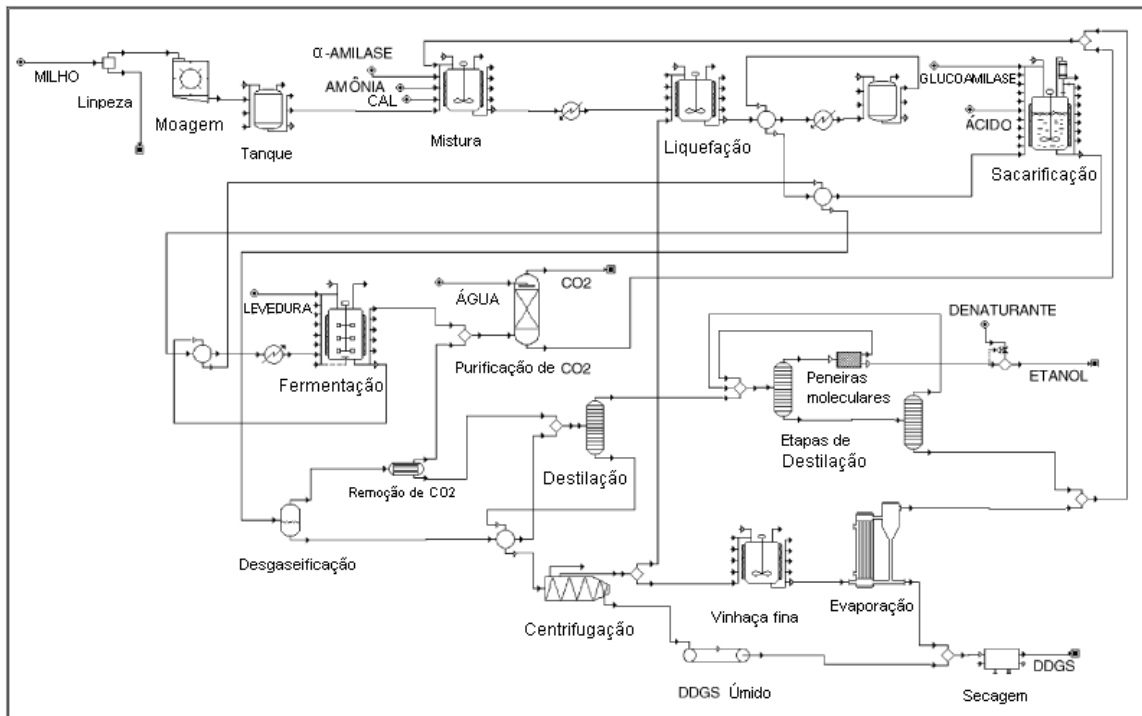


Figura 3.12: Fluxograma simplificado de produção de etanol por via seca. **Fonte:** Adaptado de KWIATKOWSKI *et al.* (2006).

Para serem economicamente viáveis, tanto a via seca quanto a via úmida dependem da receita dos co-produtos gerados. Na via seca, a renda da venda do já mencionado DDGS reduz os custos de produção de etanol. Dentre os custos de entrada, o mais significativo é o custo com a principal matéria-prima: o milho (BOTHAST e SCHLICHER, 2005). A Figura 3.13 mostra a divisão dos custos operacionais na produção de etanol pela via seca. Os custos com matérias-primas são muito elevados e correspondem a quase 70 % do total, sendo o principal o custo com milho, seguido dos custos com enzimas e desnaturante. Os custos com utilidades ficam em torno de 16 %. Entre estes, os principais são: eletricidade; vapor e gás natural. Entre os outros custos operacionais, constam custos administrativos, manutenção, taxas, mão-de-obra, seguro e custos diversos. A depreciação foi calculada com método linear por 10 anos.

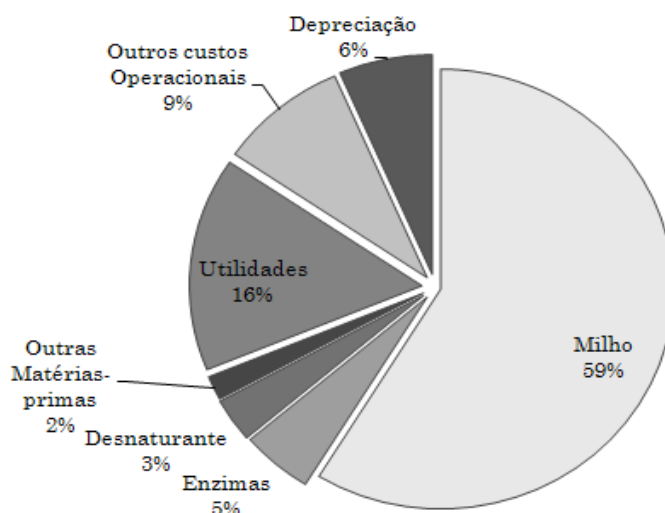


Figura 3.13: Repartição dos custos operacionais para a produção de etanol anidro pela via seca. **Fonte:** Elaborado com dados de PIMENTEL e PATZEK (2005); KWIATKOWSKI *et al.* (2006); PERKIS *et al.* (2008); QUINTERO *et al.* (2008).

3.3.6.2 Outras matérias-primas

Adicionalmente, outras biomassas que contêm elevado teor de amido também são reportadas como insumos para a produção industrial de etanol, são elas: batata (*Solanum tuberosum*); trigo (*Triticum spp.*); centeio (*Secale cereale*); sorgo (*Sorghum bicolor*); cevada (*Hordeum vulgare*) e mandioca (*Manihot esculenta*) (ROEHR, 2001).

Outra matéria-prima, não convencional, pode ser citada: a farinha de babaçu. A hidrólise do amido da farinha de babaçu, visando à produção de etanol, foi estudada por BARUQUE FILHO *et al.* (2000), cujo processo desenvolvido opera em uma planta industrial localizada em Tocantins, sendo a empresa TOBASA Bioindustrial de Babaçu S.A., detentora da primeira destilaria de álcool de babaçu em escala industrial. Um fluxograma simplificado da etapa de *upstream* deste processo de produção de etanol pode ser observado na Figura 3.14.

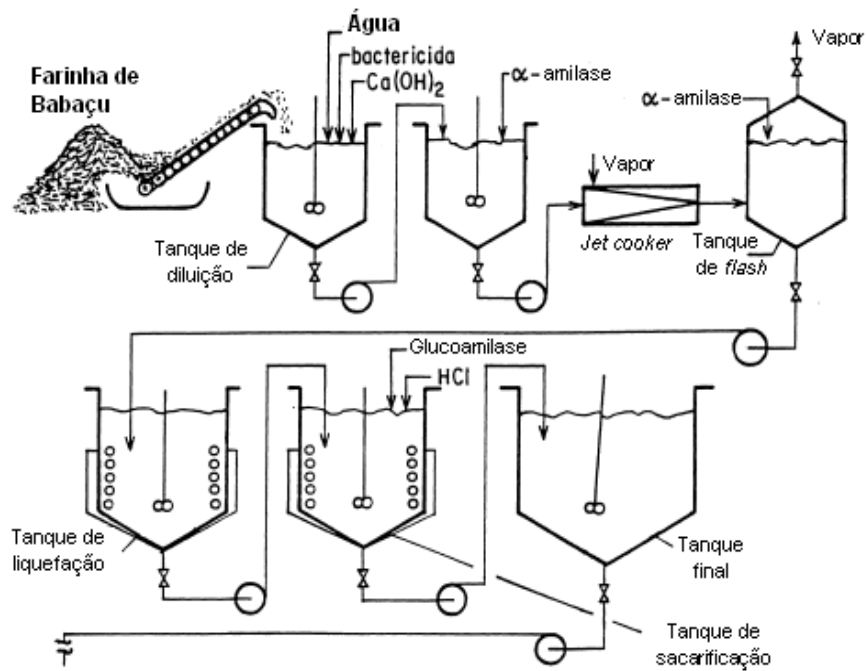


Figura 3.14: Diagrama da TOBASA para produção de etanol de farinha de babaçu: etapas de gelatinização, liquefação e sacarificação. **Fonte:** Adaptado de BARUQUE FILHO *et al.* (2000).

Conforme ilustrado na Figura 3.14, cuja representação se assemelha aos processos que utilizam as demais matérias-primas citadas para a produção de etanol, a hidrólise do substrato amiláceo ocorre em três etapas: gelatinização, liquefação e sacarificação. Segundo BARUQUE FILHO *et al.* (2000), a suspensão com a farinha é complementada com hidróxido de cálcio, a fim de assegurar uma quantidade necessária de cálcio para a atividade enzimática e para ajustar o pH para 6,0. Bactericida também é adicionado para evitar contaminações. A primeira etapa é a gelatinização, realizada em um *jet cooker* usando vapor saturado. Em seguida o amido gelatinizado é continuamente alimentado a um tanque de *flash*, que promove uma brusca perda de pressão, reduzindo a temperatura do líquido a 85-90°C. Nesta etapa ocorre a liquefação do amido pela ação de α -amilases. Como essa etapa ocorre a temperaturas elevadas (acima de 85°C), as α -amilases devem ser termoestáveis, sendo utilizadas principalmente as enzimas produzidas pelas bactérias *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*.

Já a etapa de sacarificação tem por objetivo a liberação de açúcares fermentescíveis. Nesse estágio, a temperatura é reduzida para cerca de 55-60°C, são adicionadas glucoamilases comerciais, e o valor de pH de operação (4,5-4,8) é

controlado pela adição de ácido clorídrico. Ao final desta etapa segue-se para a fermentação com *S. cerevisiae* a 30°C, em tanques abertos com agitação. Segundo BARUQUE FILHO *et al.* (1998), com esse mesmo processo, foi possível alcançar um rendimento de 0,6 L etanol/kg amido, o que corresponde a aproximadamente 290 litros de etanol por tonelada de farinha de babaçu.

Outro trabalho a partir de matérias-primas não convencionais para a produção de etanol visou investigar a utilização de grãos de sorgo, com α -amilase e glucoamilase comerciais (BARCELOS *et al.*, 2011). Após a liquefação (90°C) e sacarificação (55°C), a fermentação com *S. cerevisiae* alcançou uma concentração máxima de 105,8 g/L de etanol em 24 horas.

3.3.7 Tendências futuras: Biorrefinarias

A biorrefinaria é um conceito geral, baseado nas refinarias petroquímicas, de uma planta industrial de processamento, onde as fontes de biomassa renováveis são extraídas e convertidas em um espectro de produtos comercializáveis e em energia (KAMM e KAMM, 2004), sendo os bioprocessos essenciais para a conversão destas matérias-primas biológicas em intermediários industriais e produtos finais.

A glicose é uma substância química fundamental para os bioprocessos (KAMM e KAMM, 2007) e uma grande variedade de produtos químicos ou biotecnológicos pode ser produzida a partir dela. Além do etanol, pode-se citar o ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, butanol, sorbitol, ácido itacônico, aminoácidos, entre outros (NREL, 2004; KAMM e KAMM, 2007). Foi testada com sucesso, também, a produção de plásticos biodegradáveis, com desenvolvimento de estratégias de biorrefino, avaliando a viabilidade da produção de polihidroxibutirato (PHB) com a utilização de extratos fúngicos na hidrólise de trigo (KOUTINAS *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2010).

Estudos a respeito de biorrefinarias estão aumentando e vários conceitos de biorrefinaria surgiram como a "biorrefinaria de matérias-primas lignocelulósicas", a "biorrefinaria de colheita integral" e a "biorrefinaria verde" (KAMM e KAMM, 2004). A biorrefinaria verde é composta predominantemente de biomassas de "natureza úmida", como cultivo de grama verde, trevo e cereais imaturos. Biorrefinarias de lignocelulósicos são compostas por biomassas de "natureza seca": madeira, palha,

palha de milho, celulose contida em biomassas e resíduos. O conceito de biorrefinaria de colheita integral tem sido aplicado principalmente para trigo e milho, mas existem vários outros materiais de agricultura a serem estudados (LUO *et al.*, 2011).

Considerando a grande variedade de produtos que podem ser obtidos, o próprio etanol pode não ser o produto final. A “alcoólquímica” é o segmento da indústria química que utiliza o etanol como matéria-prima para a fabricação de diversos produtos químicos. O foco de pesquisas e investimentos não está mais restrito ao etanol combustível, mas incorpora o etanol grau químico como matéria-prima para a fabricação de produtos químicos diversos e leva à redescoberta da alcoólquímica (BASTOS, 2007). Nessa área, é importante ressaltar o interesse recente da empresa Braskem, que segue investindo na produção do “polietileno verde”, através da produção de eteno, obtido pelo processo de desidratação do etanol de cana-de-açúcar. Esta companhia anunciou, ainda, a conclusão da etapa conceitual do projeto de construção de uma planta de polipropileno verde, com expectativa de investimento de aproximadamente US\$ 100 milhões e capacidade mínima de produção de 30 mil toneladas por ano (BRASKEM, 2010).

3.4 Produção de etanol: Processo não convencional

A hidrólise completa de biomassas de composição amilácea, conforme discutido anteriormente, engloba as etapas de gelatinização e liquefação do material sólido, e uma terceira etapa com o objetivo de promover a sacarificação de oligossacarídeos liberados na etapa anterior. Essas etapas, da forma como são conduzidas industrialmente, são altamente demandantes de energia. Sob esse aspecto, torna-se importante o estudo de novas rotas, de liquefação e sacarificação das biomassas sob condições mais brandas, especialmente no que tange à temperatura da hidrólise.

O desenvolvimento de novas tecnologias está em curso. Uma alternativa para reduzir o consumo de energia pode ocorrer com a diminuição da temperatura de processamento na conversão do amido a glicose. Isso significa uma temperatura abaixo daquela em que se inicia a gelatinização do amido das diferentes matérias-primas (em geral entre 50 e 70°C) (seção 3.1.4.1).

3.4.1 A hidrólise do amido granular – “Cold Hydrolysis”

A hidrólise enzimática de amido granular não é um processo desenvolvido nos tempos modernos, tendo sido usada de alguma forma para a produção de álcool durante séculos. Evidências microscópicas da utilização do amido cru, não gelatinizado, como um substrato para bebidas alcoólicas, foram encontradas em vasos de cerâmica do Egito antigo (SAMUEL, 1996). Durante a Segunda a Guerra Mundial, pesquisas foram realizadas usando a digestão de amido cru para se obter glicose ou etanol. BALLS e SCHWIMMER (1944) foram, provavelmente, os primeiros a reportar a hidrólise do amido granular, em que os grânulos de amido de trigo não cozidos foram completamente digeridos por uma mistura de extratos do pâncreas de porcos e de *Aspergillus oryzae* (“farelo de mofo”).

Os fungos filamentosos, em geral, podem se desenvolver em diferentes ambientes, como solos, materiais orgânicos em decomposição, plantas, dentre outros. Essa diversidade de ambientes, evolutivamente, garantiu a esses organismos a capacidade de sintetizar uma série de enzimas com diferentes características, possibilitando-lhes o uso da matéria orgânica sólida do meio como fonte de carbono (GOUKA *et al.*, 1997). Portanto, estes microrganismos se candidatam como os melhores produtores de enzimas capazes de degradar o amido na forma granular, pois essa é muitas vezes sua principal forma de sobrevivência na natureza.

Esta alternativa de hidrólise em temperaturas inferiores à de gelatinização do amido tem sido descrita como: hidrólise a frio (*cold hydrolysis*); hidrólise não convencional (*non-conventional hydrolysis*); hidrólise a baixas temperaturas (*low temperature hydrolysis*); hidrólise do amido granular (*granular starch hydrolysis*) ou, ainda, hidrólise sem cozimento do amido ou do amido cru (*non-cooking* ou *raw starch hydrolysis*).

3.4.2 Fundamentos da hidrólise do amido granular

Devido ao amido granular ser insolúvel em meio aquoso, a degradação dos grânulos por enzimas ocorre na fase sólida. Estudos têm demonstrado que as enzimas primeiro adsorvem na superfície do grânulo de amido para, depois, iniciar a degradação (TEXTOR *et al.*, 1998; TATSUMI e KATANO, 2005; VIDAL *et al.*, 2009a).

A reação enzimática nesses substratos insolúveis, grânulos de amido, ocorre através de várias etapas, que envolvem: a difusão para a superfície sólida, a adsorção e, por fim, a catálise. O segundo passo é assumido como sendo um pré-requisito para a atividade catalítica subsequente, que exige que a enzima passe da fase aquosa para a fase sólida, adsorvendo-se sobre o grânulo (OATES, 1997). Essa reação de catálise heterogênea apresenta, portanto, limitações de transferência de massa, sendo este um dos motivos para que as taxas de reação de hidrólise do amido granular sejam mais lentas que as do amido gelatinizado.

Segundo VIDAL *et al.* (2009a) o mecanismo de equilíbrio de adsorção existente na hidrólise enzimática para a formação de glicose pode ser aplicado apenas no início da reação, pois, conforme avança a hidrólise enzimática, pequenas cavidades são formadas e ocorre a difusão das enzimas nos poros e nos canais dos grânulos, levando a uma nova etapa limitante da reação. A Figura 3.15 ilustra algumas das barreiras físicas para a transferência de massa que afetam a taxa de reação durante a hidrólise.

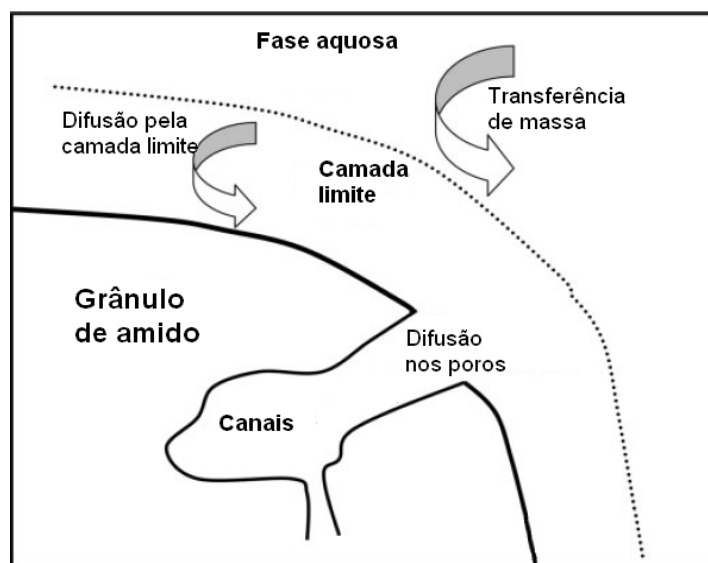


Figura 3.15: Modelo ilustrando as diferentes barreiras de transferência de massa potencialmente afetando a taxa de hidrólise de amido granular. **Fonte:** VIDAL *et al.* (2009a).

3.4.2.1 Estrutura e mecanismos de hidrólise granular

Os grânulos de amido estão bem adaptados ao seu papel de armazenamento. Eles são insolúveis em água e densamente empacotados, mas ainda passíveis de serem acessados por enzimas da planta (OATES, 1997).

Apesar de grânulos de amido serem aproximadamente esféricos, as formas variam entre esferas perfeitas, ovais, poliédricas, ou lenticulares (BULÉON *et al.*, 1998), e com diferentes diâmetros, como já descrito. A estrutura dos grânulos de amido está relacionada com a forma de digestibilidade das enzimas, por exemplo, quanto ao grau de cristalinidade e à forma com que este afeta sua área superficial. A capacidade das amilases de desenrolarem a estrutura de dupla hélice é influenciada pela distorção de cadeias vizinhas; quanto menor a mobilidade segmental (maior cristalinidade), mais difícil será a hidrólise (OATES, 1997), e quanto maior a relação área/volume dos grânulos, maior o seu potencial para ser adsorvido e, assim, hidrolisado enzimaticamente (TESTER *et al.*, 2006).

Os grânulos de amido presentes em diferentes matérias-primas podem apresentar poros. Os poros da superfície podem ser considerados como as extremidades abertas dos canais no interior dos grânulos. Estes podem ser formados durante o crescimento dos grânulos, como resultado da hidrólise enzimática. Assim sendo, o volume, a forma e o tamanho dos poros abertos também são parâmetros relevantes que influenciam a taxa de acessibilidade das enzimas para o interior de grânulos, bem como a liberação do conteúdo interno dos grânulos para a sua superfície (APINAN *et al.*, 2007). Ou seja, esses canais possibilitam a difusão de amilases através destes poros.

HELBERT *et al.* (1996) indicaram através da visualização de enzimas na superfície, dentro dos canais e dentro do núcleo dos grânulos degradados, que essas atuam primeiramente a partir da superfície para o centro (hidrólise centrípeta). Em seguida, o núcleo é completamente degradado pela erosão dentro do grânulo, atuando de forma periférica (hidrólise centrífuga). No primeiro caso (hidrólise centrípeta), as enzimas agem progredindo ao longo das cadeias de polissacarídeos, enquanto a hidrólise centrífuga leva à erosão, por um movimento mais difusivo das enzimas.

Sendo assim, o mecanismo de degradação enzimática do amido granular por α -amilases pode ser descrito pelas seguintes etapas: (i) adsorção das enzimas aleatoriamente sobre a superfície dos grânulos; (ii) início da hidrólise nestes pontos; (iii) progressão radial da hidrólise, da superfície até o centro dos grânulos e (vi)

aprisionamento das enzimas no interior do grânulo, as quais só poderão hidrolisar o substrato dentro do alcance de sua escala de difusão limitada, levando à hidrólise centrífuga (HELBERT *et al.*, 1996).

Entretanto, as α -amilases e glucoamilases são maiores do que os poros presentes nos grânulos por fatores de cerca de 10 vezes e, portanto, as amilases não são capazes de se difundir no interior dos grânulos de amido nativo sem que haja a digestão enzimática (PLANCHOT *et al.*, 2000). Este fato é consistente com o modelo descrito e sugere que as enzimas devem, inicialmente, criar seus próprios caminhos e cavidades sobre a superfície.

MORRIS *et al.* (2005) propuseram um modelo de interação em que o domínio de ligação ao amido de glucoamilase se liga às extremidades das duplas hélices de amilose expostas nas lamelas cristalinas do amido. Este domínio de ligação permite à enzima cavar, atuando como um “saca-rolha” na extremidade das hélices de amilose, facilitando a clivagem nas extremidades das cadeias de amilose (MORRIS *et al.*, 2005).

TATSUMI e KATANO (2005) estudaram a hidrólise dos grânulos de amido de diferentes tamanhos com o objetivo de elucidar a dependência da taxa de degradação sobre a superfície do substrato e da quantidade de enzima adsorvida. Foi proposto, então, um mecanismo similar, envolvendo três etapas: (i) adsorção da enzima livre sobre a superfície do substrato; (ii) reação da enzima adsorvida com o substrato e (iii) liberação do produto de hidrólise.

Além dos mecanismos teóricos descritos, com o uso de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pode-se examinar o grau de degradação sobre a superfície dos grânulos de amido, avaliando a ação enzimática. A técnica de MEV foi utilizada em uma série de estudos de hidrólise de amido granular (SUN e HENSON, 1990; SARIKAYA *et al.*, 2000; BLAZEK e GILBERT, 2010; ROCHA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010a).

SARIKAYA *et al.* (2000) investigaram a capacidade de hidrólise de α -amilases de *Bacillus amyloliquefaciens* e β -amilases de *Bacillus cereus* e de soja, em grânulos de amido de diversas fontes vegetais (batata, batata doce, arroz, trigo e milho). Já BLAZEK e GILBERT (2010) avaliaram a morfologia dos grânulos de amido parcialmente

digeridos, a partir de milho, arroz, trigo, mandioca e batata, após 24 horas de incubação com α -amilase e glucoamilase.

3.4.2.2 As enzimas envolvidas

Conforme já descrito na seção 3.2.2.1, o conjunto de todas as amilases apresenta um papel fundamental na hidrólise do amido granular. Entretanto, as matérias-primas vegetais apresentam uma diversidade de componentes em sua composição, como proteínas, celulose, hemicelulose e lignina.

Portanto, torna-se desejável que, para uma hidrólise completa do amido granular em glicose, além de amilases estejam presentes outros grupos de enzimas, tais como as proteolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas. A presença dessas outras hidrolases pode contribuir favoravelmente para uma melhor exposição dos grânulos de amido às amilases (VIDAL *et al.*, 2009b; WANG *et al.*, 2009a), hidrolisando proteínas e diferentes polissacarídeos, bem como pode melhorar a liberação de glicose, devido à hidrólise de outros polímeros de glicose, como a celulose (KIM *et al.*, 2008). Entre esse grupo de enzimas denominadas de enzimas “acessórias” (CASTRO *et al.*, 2011) estão incluídas as:

• Celulases

São enzimas capazes de degradar a complexa estrutura da celulose, que é um polímero constituído de glicose com unidades de repetição de $C_6H_{10}O_5$, com ligações glicosídicas β -1,4 (NREL, 2011). Este complexo é composto por grupos de enzimas, que podem ser classificadas de diferentes maneiras, por exemplo, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. Assim, são divididas em três grandes grupos (LYND *et al.*, 2002): i) endoglucanases, como a β -1,4-endoglucanase (EC 3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra celulósica; ii) exoglucanases, como a 1,4- β -D-glucanaglucoanohidrolase (EC 3.2.1.74) e a celobiosidase (EC 3.2.1.91), que atuam na região externa da celulose; e iii) β -glicosidases, como a β -1,4-glicosidase (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose.

• Xilanases

São enzimas hemicelulolíticas, ou seja, atuam sobre um heteropolissacarídeo constituído de pentoses e hexoses. A estrutura da hemicelulose é formada por

moléculas de manose, glicose, arabinose, galactose e xilose, tendo como seu principal componente a xilana. Esse conjunto de enzimas engloba as endoxilanases, como β -1,4-endoxilanase (EC 3.2.1.8), e as exoxilanases, como a xilana-1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37).

- **Proteases**

As enzimas proteolíticas, ou proteases, são hidrolases que atuam na catálise da quebra das ligações peptídicas. Estas enzimas são classificadas no grupo das peptidases (EC 3.4.x.x). Dentre essas, pode-se citar as endopeptidases (EC 3.4.21.x–3.4.24.x) e as exopeptidases, como, por exemplo, aminopeptidases (EC 3.4.11.x), carboxipeptidases (EC 3.4.15.x – 3.4.18.x), peptidil dipeptidases (EC 3.4.15.x), entre outras (IUBMB, 2011).

RATTANACHOMSRI *et al.* (2009) evidenciaram a atividade sinérgica de múltiplas enzimas na sacarificação do amido não gelatinizado de polpa de mandioca, demonstrando sua ação cooperativa para liberação dos grânulos de amido presos a partir da estrutura fibrosa dos componentes da parede celular. Segundo os autores, os resultados indicaram que a sacarificação eficiente da polpa de mandioca, sem gelatinização, foi possível pela ação combinada de várias enzimas acessórias, tendo sido utilizadas celulases (Celluclast® 1.5L), β -glicosidases (Novozym® 188), pectinases (Pectinex Ultra SP-L) e β -glucanases/hemicelulases (Optimash BG), juntamente com enzimas amilolíticas, como a glucoamilase (AMG 300 L) e α -amilase (Termamyl® 120 L).

3.4.3 Hidrólise do amido granular na produção de etanol

O processo de hidrólise do amido na forma granular, conforme explicado anteriormente, deve ocorrer em temperaturas abaixo da gelatinização do amido, em torno de 30-40°C. Desta forma, podem-se eliminar as etapas de liquefação e cozimento existentes nos processos convencionais de produção de etanol de amido (GALVEZ, 2005), representando um novo processo de baixo consumo energético.

Nos últimos anos, essa tecnologia alternativa ganhou força com o interesse de grandes empresas norte-americanas, que, em associação com empresas produtoras de enzimas, desenvolveram produtos específicos para a produção de etanol em

temperaturas mais baixas. Duas empresas lideram o desenvolvimento dessas enzimas, que são disponíveis comercialmente: a Genencor Internacional Inc. tem o seu produto registrado como Stargen™ e, com a tecnologia da Novozymes, foi licenciado pela Poet LLC o produto com a marca BPX™ (Broin Project X) (SCHILL, 2008). Na linha Stargen™ de produtos, os preparados enzimáticos Stargen™ 001 ou 002 são formulados contendo α -amilase de *Aspergillus kawachi*, expressa em *Trichoderma reesei*, e glicoamilase de *Aspergillus niger* ou de *Trichoderma reesei*. A Novozymes, em parceria com as empresas Broin, desenvolveu um processo de hidrólise a frio, também a partir de enzimas fúngicas, com alta capacidade de converter o amido em açúcares fermentescíveis, sem o processo de cozimento tradicional (HUSTON *et al.*, 2008). Dentre as principais enzimas da Novozymes, pode-se citar Spirizyme® Fuel (glucoamilase) e Liquozyme® (α -amilase).

Portanto, é possível produzir etanol de amido com menor demanda energética associada às etapas de cozimento, liquefação e sacarificação. Para este processo, o amido granular, não gelatinizado, pode ser submetido a uma etapa inicial de pré-sacarificação. A pré-sacarificação confere uma hidratação à matéria-prima, tornado os grânulos de amido mais suscetíveis à ação hidrolítica e também promovendo uma hidrólise inicial (LEHMANN e ROBIN, 2007; VIDAL *et al.*, 2009a). Nesta etapa são utilizadas as enzimas necessárias para a degradação do amido (em inglês, *Granular Starch Hydrolyzing Enzymes – GSHE*): amilases e demais enzimas acessórias (proteases, celulases e hemicelulases) (LEHMANN e ROBIN, 2007; KOPNIECZNY-JANDA *et al.*, 2008; RATTANACHOMSRI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009a). A pré-sacarificação é conduzida por intervalo de tempo próximo a 2 horas e a uma temperatura um pouco mais elevada, no entanto, ainda inferior à temperatura de gelatinização do amido, entre 40 e 57°C. O pH nesta etapa é ácido, entre 3,5 e 4,5, faixa de pH ótima para atuação da maioria das enzimas em ação, sendo, normalmente, utilizado ácido sulfúrico para o ajuste de pH (WANG *et al.*, 2005).

Uma suspensão com alto teor de sólidos, contendo os grânulos de amido presentes na matéria-prima, segue para o fermentador, podendo ou não haver mais adição de enzimas, onde ocorrem a sacarificação e fermentação simultaneamente (SSF). Para tal, deve haver a adição do microrganismo fermentativo, normalmente

levedura, e a temperatura segue constante até o final do processo, em cerca de 30-33°C. O pH para a etapa de SSF se mantém ácido, entre 3,3 e 4,5 e, havendo necessidade, adiciona-se uma fonte de nitrogênio, como no processo convencional (descrito na seção 3.3.6.1).

A Figura 3.16 ilustra as principais diferenças entre estes dois processos: processo convencional (via seca) e processo de baixo consumo energético (não convencional).

A representação da Figura 3.16 permite evidenciar as principais etapas que são eliminadas no processo de baixo consumo energético, em relação ao processo convencional de produção de etanol pela via seca. Essa mostra, ainda, a necessidade de um complexo enzimático capaz de atuar sobre o amido granular. As etapas de ajuste de pH, bem como a adição de fonte de nitrogênio, foram omitidas em ambos os processos, para efeito de simplificação das ilustrações.

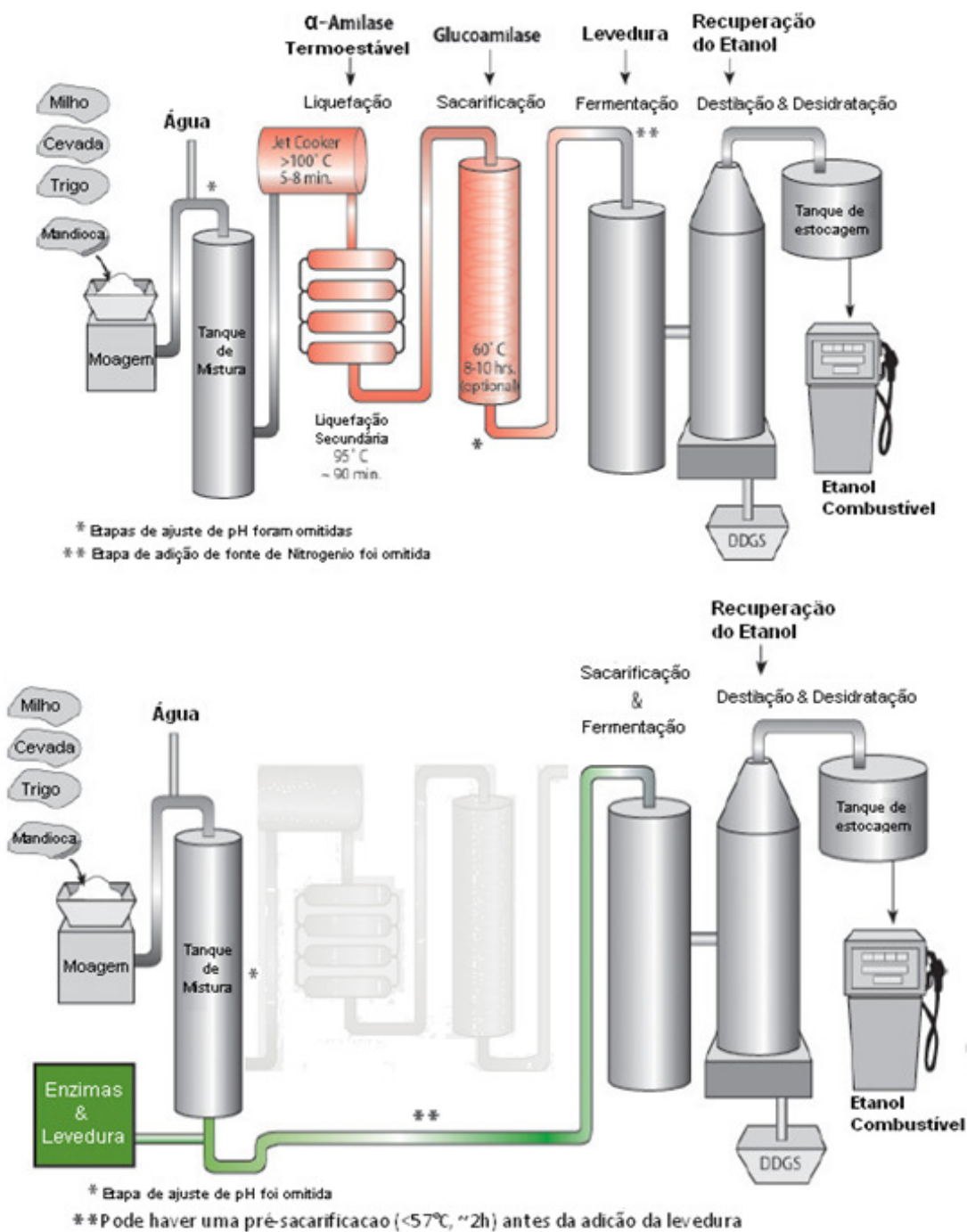


Figura 3.16: Representação ilustrativa do processo convencional (via seca) e do processo de baixo consumo energético (não convencional). Em tons mais claros são mostradas as etapas do processo convencional que não são necessários no processo não convencional. **Fonte:**

Adaptado de GENENCOR (2008).

Entre as principais vantagens da produção de etanol por esse processo não convencional, por hidrólise do amido granular, em relação aos processos convencionais de amiláceos, pode-se citar:

- **Menor custo de capital.** Com a eliminação de duas unidades de operação, uma vez que todo o processo de liquefação, sacarificação e fermentação pode ocorrer em um único reator, o investimento em equipamentos é menor, representando uma diminuição nos custos de capital da planta;
- **Menores custos operacionais.** Sem a necessidade destas etapas altamente demandantes de energia, há uma drástica redução no consumo de vapor do processo, representado redução nos custos de utilidades.

Com relação à redução no gasto energético, ROBERTSON *et al.* (2006) introduziram o termo “entalpia de excesso de fermentação”, definida como a energia requerida para aquecer os grânulos de amido e a suspensão líquida da temperatura de fermentação (30°C) até as temperaturas de cozimento. Segundo os autores, a demanda de energia do processo convencional é equivalente a 10-20 % do valor energético do etanol combustível produzido.

O amido gelatinizado apresenta uma alta viscosidade, podendo chegar a valores até 20 vezes maiores do que o amido em suspensão, dificultando agitação e bombeamento. Portanto, a redução da viscosidade favorece a capacidade de operação desses equipamentos (KELSALL e LYONS, 2003).

Outras reduções nos custos operacionais se devem aos menores custos de insumos, como água, ácidos e bases, pois neste processo existem menos etapas de requerimento de ajustes de pH, por exemplo. O processo apresenta, ainda, menores custos com manutenção de equipamentos e outros gastos variáveis associados às extintas etapas de liquefação e cozimento;

- **Maior rendimento potencial.** As elevadas temperaturas a que o amido fica submetido podem ocasionar reações indesejáveis no processo convencional, como a reação de *Maillard*. Esta é definida como uma reação entre compostos nitrogenados, como aminoácidos e proteínas, com um açúcar redutor, diminuindo, assim, a concentração de componentes importantes e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento teórico.

Outro fator que potencialmente aumenta o rendimento da produção de etanol é liberação gradual do substrato (glicose). Com as etapas de sacarificação e fermentação ocorrendo simultaneamente, as leveduras não

entram em contato com uma quantidade muito elevada de glicose, havendo menor estresse osmótico e menor produção de subprodutos da fermentação, como óleos, glicerol e outros álcoois. A liberação gradual concomitante ao consumo de glicose também favorece a hidrólise, devido à menor inibição das amilases pelo produto de hidrólise (LIM *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006).

Entre as desvantagens, encontram-se os custos de obtenção das enzimas capazes de atuar com alta eficiência na conversão do amido granular, dentro das condições descritas para o processo (HUSTON *et al.*, 2008). Segundo GALVEZ (2005), outra desvantagem está associada ao fato de as etapas de liquefação e cozimento promoverem a esterilização dos meios de fermentação. Os grãos da matéria vegetal, quando colhidos, apresentam diversos microrganismos e muitos destes podem competir com a levedura e reduzir a produtividade da fermentação. A cinética de reação deste processo também é desfavorecida devido às temperaturas abaixo das temperaturas ótimas na maior parte do tempo de ação das enzimas e pelas limitações de transferência de massa, conforme exposto na seção 3.4.2.

3.4.4 Estado da arte

Com a finalidade de avaliar os processos de hidrólise do amido granular, a Tabela 3.4 apresenta alguns parâmetros e respostas obtidas na literatura. É importante ressaltar que estão exibidos apenas os resultados de hidrólise, visto que alguns estudos na literatura focam apenas na etapa de hidrólise do amido granular, enquanto outros investigam todo o processo de produção de etanol. Para melhor visualização e compreensão, os resultados foram divididos em duas tabelas, sendo esta primeira dedicada aos dados de hidrólise.

O levantamento dos estudos da hidrólise mostra resultados desde os primeiros experimentos até alguns dos mais recentes (BALLS e SCHWIMMER, 1944; LI *et al.*, 2012), todos realizados sem a gelatinização do amido. Dentre os trabalhos compilados nesta revisão da literatura, tem-se presente o trabalho de TEXTOR *et al.* (1998), que seria uma das primeiras citações do termo hidrólise a frio (*cold hydrolysis*), estudando o efeito de três tipos de α -amilases na degradação dos grânulos de amido de trigo e obtendo um dos melhores resultados. Contudo, sua resposta era apenas o amido

residual, permanecendo, provavelmente, uma grande quantidade de oligômeros. Duas patentes (PICKENS *et al.*, 1986; KOPNIECZNY-JANDA *et al.*, 2008) sobre a hidrólise do amido granular citam exemplos de hidrólise sobre grânulos de amido genéricos ou amido de cevada, respectivamente.

RATTANACHOMSRI *et al.* (2009) investigaram a ação de um preparado enzimático próprio, produzido por fermentação submersa com *Aspergillus niger*, na hidrólise da polpa de mandioca. CASTRO *et al.* (2010b) também utilizaram extrato enzimático próprio, produzido por *A. awamori* por fermentação estado sólido na hidrólise de torta de babaçu.

LI *et al.* (2012) estudaram o efeito do tratamento com uma etapa de pré-aquecimento 5°C abaixo da temperatura de gelatinização do milho e de tritcale (um cereal obtido pelo cruzamento artificial de trigo e centeio), embora neste levantamento constem apenas os resultados sem a presença deste pré-aquecimento, a temperatura constante de 30°C. Segundo os autores, com pré-aquecimento de 30 min a 51-60°C, poder-se-ia chegar a até 80 % de eficiência de hidrólise, em menos tempo de reação (48 h). SHARIFFA *et al.* (2009) relataram que uma etapa de pré-aquecimento sobre os grânulos de amidos de mandioca e batata-doce a 60°C por 30 min representou um aumento no grau de hidrólise de até 14 % após 24 h de hidrólise, em comparação com os processos sem o pré-aquecimento. Segundo os autores, o pré-aquecimento a uma temperatura de sub-gelatinização pode causar o rompimento parcial da estrutura de amido com um inchaço da região amorfa e expansão de cavidades dos grânulos de amido, tornando os grânulos mais suscetíveis ao acesso das enzimas.

Tabela 3.4: Levantamento da literatura sobre os processos de hidrólise do amido granular. Nos casos em que mais de uma matéria-prima foi utilizada, as respostas estão designadas na mesma ordem das matérias-primas.

Matérias-primas	Condições de hidrólise	Enzimas	Respostas	Referências
Polpa de Mandioca	T=40°C, pH=5,0 Por 48 h	Extrato de <i>A. niger</i>	91,2% de eficiência de hidrólise	RATTANACHOMSRI <i>et al.</i> (2009)
Amido de Trigo	T=45°C, pH=4,5 por 3 h	α -amilase de <i>A. oryzae</i> , <i>bacillus</i> e cevada	98% de eficiência de hidrólise	TEXTOR <i>et al.</i> (1998)
Cevada	T=57°C, pH=3,6 por 1,5 h	STARGEN 001 e OPTIMASH BG	28,4% de eficiência de hidrólise	KOPNIECZNY-JANDA <i>et al.</i> (2008)
Milho	T=48°C, pH=4,2 por 2 h	STARGEN 001	NR	WANG <i>et al.</i> (2005)
Amido	T=55°C, pH=5,5 por 96 h	<i>Humicola griseus</i> var. <i>thermoidea</i>	88% de eficiência de hidrólise	PICKENS <i>et al.</i> (1986)
Milho e Mandioca	T=35°C, pH=4,4 por 24 h	STARGEN 001	52,6 % e 35,4% de degradação da MP	UTHUMPORN <i>et al.</i> (2009)
Triticale e Milho	T=30°C, por 96 h	STARGEN 002	64 % e 60 % de eficiência de hidrólise	LI <i>et al.</i> (2012)
Trigo, Milho e Arroz	T=37°, pH=6,0 por 24 h	α -amilase pancreática e glucoamilase de <i>A.niger</i>	48%, 50% e 51% de eficiência de hidrólise	BLAZEK e GILBERT (2010)
Trigo	T=50°C, pH=5,2 por 3 h	α -amilase pancreática e farelo de <i>A. oryzae</i>	95,7% de eficiência de hidrólise	BALLS e SCHWIMMER (1944)
Torta de Babaçu	T=45-51°C, pH=3,6-3,9 por 24 h	Extrato de <i>A. awamori</i>	52% de eficiência de hidrólise	CASTRO <i>et al.</i> (2010)

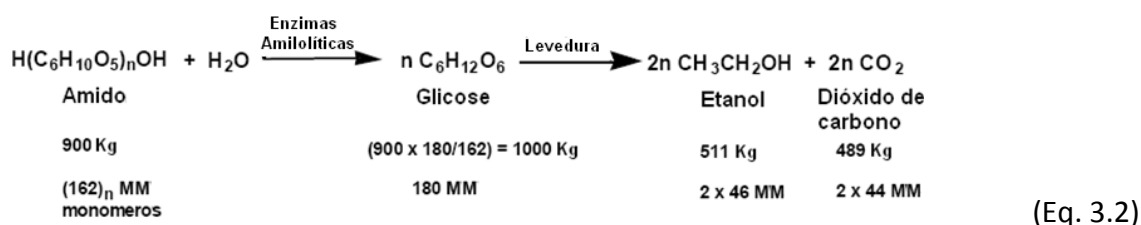
NR: valores não reportados; MP: Matéria-Prima

As respostas estão apresentadas como eficiência de hidrólise ou degradação da matéria-prima. A eficiência de hidrólise é definida pela Equação 3.1. Para o uso desta equação considera-se que todo produto de hidrólise é glicose, embora muitos dos resultados obtidos na literatura meçam como resposta apenas os açúcares redutores totais (mesmo que expressos como glicose).

$$\text{Eficiência de Hidrólise (\%)} = \frac{\left(\frac{162}{180}\right) \times (\text{Glicose}_{\text{final}} - \text{Glicose}_{\text{inicial}})}{\text{Teor de Amido na matéria - prima}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Em que *glicose* e *teor de amido* estão expressos por concentração em g/L.

O fator (162/180) ou 0,9 aparece devido à estequiometria da reação, em que há a incorporação uma molécula de H₂O para cada uma de glicose formada. Usando a relação estequiométrica para a conversão de amido em glicose, partindo de 900 kg de amido, tem-se a produção máxima de 1 000 kg de glicose em uma hidrólise completa. Esta relação pode ser vista pela Equação 3.2.



Como, em alguns casos, não foram reportados com precisão o teor de amido nas referidas matérias-primas e o próprio estudo adotou uma resposta por conversão da matéria-prima em glicose, foi adotado o percentual de degradação da matéria-prima, como foi para a referência UTHUMPORN *et al* (2009).

Com relação à produção de etanol através dos processos de hidrólise do amido granular, têm-se diferentes variáveis de resposta com relação à hidrólise. Além da hidrólise, ocorre também, neste caso, a fermentação alcoólica, e as respostas são medidas por eficiência de conversão – levando em conta a conversão de amido em etanol, o rendimento e a produtividade. A Tabela 3.5 resume alguns resultados obtidos da literatura. Alguns trabalhos são os mesmos, mas como foram divididos em duas etapas distintas, constam, aqui, os dois resultados obtidos. Todos os experimentos foram realizados com agitação. Os trabalhos de WANG *et al.* (2005), KOPNIECZNY-JANDA *et al.* (2008) e RATTANACHOMSRI *et al.* (2009) estão divididos nas duas listagens, mostrando que estes experimentos foram precedidos de uma etapa em diferentes condições (uma pré-sacarificação). Portanto, nesta tabela podem-se observar os resultados finais do processo (produção de etanol), as condições da fermentação (na verdade sacarificação e fermentação, já que ocorrem simultaneamente), as enzimas utilizadas e outros suplementos, como fontes de nitrogênio. Vale a pena notar a presença dos preparados comerciais, como o STARGEN™ e BPX™, que vem sendo cada vez mais utilizados e citados na literatura. As respostas foram expostas como produtividade (expressa em g/(L·h)) e eficiência de conversão, que leva em conta o rendimento máximo de conversão do amido a etanol,

conforme a Equação 3.2. Assim, o máximo de 0,568 kg etanol/kg amido pode ser obtido e sobre este valor calcula-se o percentual de conversão. Entre os melhores resultados, destaca-se o resultado de uma patente de produção de etanol por hidrólise granular de autoria da empresa Novozymes (LEWIS *et al.*, 2004), que utiliza uma concentração elevada de sólidos iniciais, 36 % (m/m) de milho em massa seca, e chega a 19 % (v/v) de etanol e uma produtividade de 2,32 g/(L.h).

Tabela 3.5: Levantamento da literatura sobre os processos de produção de etanol por hidrólise do amido granular, conduzidos com fermentação e sacarificação simultâneas.

Matérias-primas	Condições de fermentação	Enzimas e suplementos	Resposta de Etanol	Referências
Polpa de Mandioca	T=40°C, pH=5,0 Por 48 h	Extrato de <i>A. niger</i> Ext. levedura, peptona e sais	0,48 g/(L.h) e 85,4% de eficiência de conversão	RATTANACHOMSRI <i>et al.</i> (2009)
Milho	T=32°C, pH=4,2 por 72 h	Enzimas de <i>A. niger</i> e <i>A. awamori</i>	89,6 % de eficiência de conversão	WELLER <i>et al.</i> (1983)
Cevada	T=32°C, pH=3,3 por 50 h	STARGEN 001, OPTIMASHBG, 400 ppm de uréia e proteases	2,18 g/(L.h) e 95,8 % de eficiência de conversão	KOPNIECZNY- JANDA <i>et al.</i> (2008)
Milho	T=30°C, pH=4,2 por 48 h	STARGEN 001 sulfato de amônio	86,4 % de eficiência de conversão	WANG <i>et al.</i> (2005)
Farinha de Milho	T=35°C, pH=5,0 por 72 h	STARGEN 001 e protease	1,32 g/(L.h) e 84,6 % de eficiência de conversão	BIALAS <i>et al.</i> (2010)
Sagu	T=40°C, pH=3,5	Co-cultivo de <i>A. niger</i> e <i>S. cerevisiae</i>	70,5 % de eficiência de conversão	PRANAMUDA <i>et al.</i> (1995)
Milho	T=27°, pH=4,2 por 96 h	Enzimas RHS BPX™ e uréia 0,03% (m/m)	1,32 g/(L.h) chegando a 18,5 % (v/v) de etanol	LAMSAL <i>et al.</i> (2011)
Farinha de Milho	T=28°C, pH=5,0 por 65 h	Spirizyme Plus, Proteases, uréia e sulfato de zinco	2,32 g/(L.h) e 88,9 % de eficiência de conversão	LEWIS <i>et al.</i> (2004)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

A torta de babaçu e a farinha de babaçu foram gentilmente cedidas pela TOBASA Bioindustrial de Babaçu S.A. A torta foi obtida após a prensagem e remoção do óleo da amêndoa do coco de babaçu enquanto a farinha de babaçu foi obtida a partir do esmagamento mecânico do mesocarpo do coco de babaçu.

A torta de babaçu foi recebida com um tamanho médio de partícula de $(923 \pm 7) \mu\text{m}$, que foi estimado, utilizando um agitador vibratório (Test Sieve Shaker, Viatest) acoplado com peneiras variando de 8 a 150 *mesh* Tyler. Apesar de, a torta bruta ser proveniente de um processo industrial, esta apresentava algumas partículas aglomeradas (grumos empedrados) e desta forma, foram previamente trituradas, moídas e em seguida peneiradas. Após a etapa de peneiramento foram utilizadas as frações não retidas nas peneiras de 14 *mesh* Tyler, ou seja, com diâmetro de partículas menores que 1,19 mm. Tal faixa granulométrica foi selecionada visando à maior produtividade das enzimas amilolíticas e das acessórias na fermentação em estado sólido a partir de estudos prévios (CASTRO, 2010).

A farinha de babaçu apresenta uma granulometria muito mais fina e esta foi recebida com um tamanho médio de partícula de $(142 \pm 9) \mu\text{m}$, tendo sido estimado com peneiras 24-400 *mesh* Tyler.

4.1.1 Teor de umidade

O teor de umidade das matérias-primas foi determinado com 200 a 500 mg de amostra a uma temperatura de 160 °C, em uma câmara fechada sobre uma balança (MX-50, AND). Para o cálculo de teor de umidade na caracterização da farinha de babaçu, este procedimento foi realizado com 10 repetições.

4.1.2 Caracterização físico-química

A análise de caracterização química da farinha do coco de babaçu, relativo aos teores de amido, proteína, hemicelulose, celulose e lignina, foi realizada pelo

Laboratório de Controle Bromatológico (LabCBrom). Segundo procedimentos determinados pelas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005), métodos analíticos da AOAC (AOAC INTERNACIONAL, 1995) e ainda por método de fibra detergente neutro modificado para amostras com alto teor de amido (MENDEZ *et al.*, 1985). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2 Microrganismos

O microrganismo utilizado neste trabalho visando à produção das enzimas foi a cepa *Aspergillus awamori* IOC-3914, selecionada com base na literatura (CASTRO *et al.*, 2010b) e obtida a partir da coleção de culturas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Visando a etapa de fermentação, foi obtida uma cepa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) de alta capacidade de fermentação, proveniente da usina Japungu (Santa Rita, PB), denominada de JP1 (SILVA-FILHO *et al.*, 2005). Esta linhagem industrial demonstrou ainda ser mais resistente às contaminações e aos estresses ambientais encontrados na indústria sucroalcooleira.

Foram ainda avaliadas outras diferentes cepas de levedura recombinantes, para o potencial de fermentação, sendo estas *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem MFL (semi-industrial). Gentilmente cedida pela Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes. Foram obtidas cinco cepas geneticamente modificadas com diferentes estratégias de ação sobre o amido, contendo os genes de expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis* e/ou glucoamilase de *Aspergillus awamori* (MORAES *et al.*, 1995). Foram denominadas de:

- Alfa-amilase: contendo o gene da α -amilase;
- A2: Contendo o gene da α -amilase e glucoamilase;
- Glucoamilase: Contendo o gene da glucoamilase;
- B5: α -amilase e glucoamilase fusionadas;
- Alfa-aglutinina: α -amilase fusionada à extremidade C-terminal da alfa-aglutinina.

A estratégia da cepa Alfa-aglutinina seria de direcionar a produção da amilase para a parede celular da célula. A α -aglutinina com a sequência sinal para âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) responsável pelo sinal de fixação teria a capacidade de

sinalizar e manter a enzima produzida ancorada na estrutura da parede celular da levedura. Importante ressaltar que a clonagem foi realizada com um plasmídeo do tipo vetor episomal, ou seja, atuam autonomamente, não é um vetor integrativo.

4.3 Manutenção, propagação e composição dos meios

A descrição dos meios e condições de manutenção e propagação dos microrganismos segue nesta seção. Todos os meios após seu preparo foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

4.3.1 Manutenção dos microrganismos

4.3.1.1 *Aspergillus awamori*

A linhagem de *Aspergillus awamori* foi mantida em meio contendo amido como única fonte de carbono. A composição deste meio amido (adaptado de RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004) contém: 10 g/L de amido; nitrato de sódio, 3 g/L; fosfato de potássio, 1 g/L; sulfato de magnésio, 0,5 g/L; sulfato de ferro, 0,001 g/L; e 20 g/L de ágar.

4.3.1.2 JP1

Para manutenção, a cepa levedura JP1 foi repicada em meio YPD ágar em placas de *petri* contendo: 10 g/L de extrato de levedura (Himedia), 20 g/L peptona (Himedia), 20 g/L glicose (Vetec), 20 g/L ágar (Vetec). O ajuste de pH=5,0 com ácido sulfúrico, incubada a 30 °C por 48 h e estocada a 4 °C.

4.3.1.3 *Recombinantes*

O método utilizado para a conservação das cepas recombinantes foi repicagem em placa de *petri* com ágar dextrose batata, meio comercial de PDA 35 g/L (Merck). As placas foram incubadas a 30 °C por 72 h e estocadas a 4 °C.

4.3.2 Meios e condições de propagação

4.3.2.1 *Aspergillus awamori*

A linhagem do fungo filamentosos *A. awamori* apresenta alta capacidade de produção de amilases e a presença de amido no meio estimula essa produção, o meio nesta etapa serve ainda para aclimação do fungo. Portanto foi escolhido um meio aveia, que apresenta elevado teor de amido, alta produção de esporos do fungo e um menor custo (CASTRO *et al.*, 2010a).

Os esporos fúngicos foram propagados inicialmente por sete dias a 30 °C em meio de aveia (adaptado de DAMASO *et al.*, 2004): com 50 g/L de farelo de aveia (farelo fino Quaker) e 15 g/L de ágar (Vetec). Sendo posteriormente propagados em meio líquido, etapa de pré-inóculo em meio malte, contendo 35 g/L extrato de malte (Sigma). As células foram incubadas a 30 °C e os sistemas foram mantidos sob agitação orbital de 200 rpm. Depois de 28 horas de pré-inóculo, as células e as matérias-primas remanescentes do crescimento foram transferidas para torta de babaçu para inocular o sistema de fermentação.

4.3.2.2 *Cepa JP1*

O cultivo de células para propagação do inóculo de levedura JP1 foi realizado em frascos cônicos de 500 mL com 100 mL de meio líquido, garantindo assim uma maior possibilidade de aeração. Meio de propagação: YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose). As células de levedura eram transferidas das placas para este meio de forma a garantir uma partida sempre da mesma concentração inicial (0,14 g/L em base seca). O pH foi ajustado para 5,0 com ácido sulfúrico, mantidos a temperatura de 32 °C e sob agitação orbital de 250 rpm. A duração de propagação do cultivo foi determinada baseada na duração da fase exponencial de crescimento, de acordo com os experimentos de cinética realizados.

4.3.2.3 *Cepas recombinantes*

A propagação do inóculo de células de levedura das cinco cepas recombinantes foi realizada no meio denominado YPS2 (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 18 g/L amido solúvel P.A., e 2 g/L glicose) em pH=5 ajustado com ácido sulfúrico. As

células também foram transferidas das placas para este meio de forma a garantir uma partida sempre da mesma concentração inicial (0,14 g/L em base seca). A propagação foi mantida a 30 °C e agitação orbital de 200 rpm. O tempo de propagação do cultivo também foi determinado baseado na duração da fase exponencial de crescimento, de acordo com os experimentos de cinética realizados.

4.4 Determinações quantitativas e composição de soluções utilizadas

Dentre as determinações quantitativas estão presentes as quantificações enzimáticas, tais metodologias foram adaptadas de trabalhos reportados na literatura. Para todas as adequações foram efetuados previamente, estudos cinéticos no laboratório, a fim de verificar se, nas condições adotadas, as enzimas estavam na taxa inicial de reação, bem como determinar os limites da faixa de linear de cada método. Todas as quantificações espectrofotométricas foram realizadas no equipamento Biospectro SP-22. Com relação ao cálculo das atividades enzimáticas, foram utilizadas: A atividade (U/mL) leva em conta o volume do extrato enzimático, então, neste caso, divide-se o valor da atividade pelo volume de extrato aplicado na análise; e a atividade específica (U/mg_{proteína}) o valor de atividade foi dividido pela massa de proteínas total presente na amostra.

4.4.1 Solução tampão universal

O preparo deste tampão consiste na mistura de duas soluções estoque, uma ácida (solução A) e uma alcalina (solução B), em diferentes proporções, de acordo com o pH desejado (BRITTON e ROBINSON, 1931). As soluções são descritas a seguir.

- Solução A: Solução 40 mM dos ácidos fosfórico, acético e bórico;
- Solução B: Solução 200 mM de NaOH

Para a obtenção de uma solução tampão 120 mM de pH 5,0 foram adicionados 25,8 mL da solução A, e o restante aferido com a solução B até um volume final de 100 mL. Quando necessário, ajustou-se o pH com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N.

4.4.2 Padrão de amido

Foram utilizadas duas soluções padrão de amido P.A. (Vetec) para dosagem das atividades amilolíticas, em que se utilizou uma concentração de 10 g/L. Os padrões foram preparados utilizando-se tampão universal pH 5,0. As soluções foram mantidas a 4 °C quando não utilizadas, por um período máximo de 10 dias.

4.4.3 Quantificação de glicose

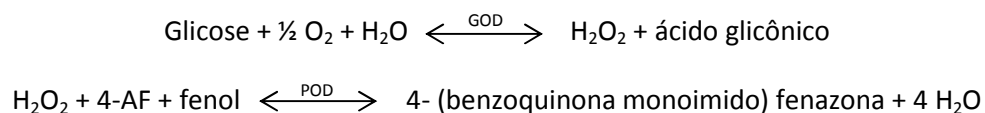
Para determinação de glicose foi utilizado o método enzimático de GOD-POD. Este é um método analítico enzimático, devido à ação das enzimas glicose oxidase e peroxidase.

Este reativo é obtido a partir da mistura das seguintes soluções, já preparadas em um *kit* comercial (LaborLab):

- Solução A: Contém 25 mM de 4-aminofenazona (4-AF) em tampão Tris 920 mM;
- Solução B: Contém 55 mM de fenol;
- Solução C: Solução enzimática contendo acima de 1kU/mL de glicose oxidase (GOD) e peroxidase (POD) com atividade superior 0,15 kU/mL de

Para o preparo de 100 mL de reativo, adicionou-se, 5 mL da solução A, 5 mL da solução B, 300 µL da solução C e o volume foi completado com água destilada.

As reações envolvidas na quantificação de glicose a partir desse reativo são mostradas a seguir.



A concentração de glicose foi determinada incubando-se 100 µL de amostra com 1 mL de reativo enzimático por 10 minutos em banho termostático a 40 °C. A geração de cor é proporcional à concentração de corante oxidado, e sua absorvância pode ser medida a 505 nm. Cada análise foi realizada em triplicata.

4.4.4 Dosagem de Açúcares Redutores Totais (ART)

O reagente de DNS foi preparado seguindo-se as concentrações apresentadas na Tabela 4.1. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e o NaOH foram previamente dissolvidos e em seguida foram adicionados os demais componentes.

Tabela 4.1: Composição do reagente original de DNS. **Fonte:** SUMNER (1921).

Componente	Quantidade
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
Sal de Rochele (tartarato duplo de sódio e potássio)	306,0 g
Fenol	7,6 mL
Metabissulfito de sódio	8,3 g
Água destilada	1416 mL

Além da concentração específica de glicose, determinou-se para algumas amostras a liberação de açúcares redutores totais durante os experimentos de hidrólise das matérias-primas. Para tal, incuba-se 100 μL de amostra com 300 μL de reagente de DNS por 5 min a 100°C. Em seguida, adiciona-se 1,0 mL de água destilada e a absorvância das soluções medida a 540 nm, contra um branco reacional que foi submetido às mesmas etapas que as amostras, apenas substituindo-se os 100 μL de extrato enzimático por 100 μL de água (MILLER, 1959).

4.4.5 Quantificação de amido solúvel

Para determinação da concentração de amido em solução, 100 μL foram adicionados 90 μL de uma solução de iodo 0,01 N em HCl 0,02 N. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de água destilada. A geração de cor é proporcional à concentração do iodo complexado ao amido, e absorvância das soluções medida a 640 nm (Adaptado de FIGUEIRA e HIROOKA, 2000). Para realização do branco, substitui-se 100 μL de amostra por 100 μL de água destilada.

4.4.6 Quantificações por cromatografia líquida (HPLC)

Além das análises de ART e de glicose por método enzimático, em experimentos de hidrólise selecionados, os perfis de carboidratos foram analisados usando uma cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Technologies) (HPLC – *High Performance Liquid Chromatograph*) equipada com um detector de índice de refração. Para a separação de açúcares, uma coluna HPX-87P (BioRad®) foi utilizada. Temperaturas do forno e do detector foram fixadas em 80 °C e 35 °C, respectivamente. Água deionizada foi utilizada como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. A determinação da concentração de etanol e glicerol dos experimentos de SSF também foi realizada por HPLC. Para esses experimentos de produção de etanol, as análises foram realizadas nessa mesma coluna ou em outra coluna HPX-87H (BioRad®), que tem a capacidade de quantificar ácidos orgânicos além de etanol e glicerol. Para esta coluna foi utilizado uma fase móvel de 0,005 M de ácido sulfúrico em água ultrapura com vazão de 0,6 mL/min e temperatura do forno de 65 °C.

Foram utilizadas soluções padrões de glicose, maltose, maltotriose, xilose (Sigma–Aldrich), além de glicerol grau HPLC (Tedia) e etanol grau HPLC (Merck).

4.4.7 Quantificação de FAN

Para determinar nitrogênio livre (*Free Amino Nitrogen – FAN*) foi utilizado um método colorimétrico com ninidrina (LIE, 1976 apud WANG *et al.*, 2009b). Este método permite identificar o amino nitrogênio em solução, como o grupo amino dos aminoácidos. Para tal, foram adicionados 1,0 mL de amostra e 500 µL da solução de coloração em tubos de ensaio e incubados a 100 °C por 16 minutos. Após o resfriamento em água corrente, foram adicionados 5 mL da solução de diluição. A leitura de absorvância foi realizada a 570 nm e a curva padrão realizada com uma solução padrão de glicina.

A solução de coloração foi preparada com fosfato de sódio dibásico, ninidrina, frutose e fosfato de potássio monobásico em água destilada. Enquanto a solução de diluição com iodeto de potássio, água destilada e etanol P.A.

4.4.8 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína extracelular total dos extratos enzimáticos foi determinada segundo uma adaptação do método descrito por BRADFORD (1976). Incubou-se 20 µL de amostra com 180 µL de reagente à base do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad *protein assay dye reagent concentrate*) diluído 4 vezes com água ultrapura. As amostras foram aplicadas sobre placas de Elisa de 96 poços e o sistema foi mantido sob agitação por 10 minutos a temperatura ambiente. A absorvância das soluções foi determinada a 595 nm pela utilização de um leitor automático de microplacas (PowerWave XS, Biotek). O branco reacional continha 20 µL de água, ao invés de amostra. As análises foram realizadas em triplicata. A curva padrão que correlaciona valores de absorvância ao conteúdo de proteína das soluções foi obtida utilizando-se albumina bovina sérica (BSA, Sigma) como padrão em concentrações na faixa de 10 a 100 mg/L. Os pontos da curva padrão foram submetidos às mesmas etapas que as amostras dos extratos enzimáticos, para sua quantificação.

4.4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi usada para análise da massa molar das enzimas presente e pureza do extrato enzimático. Foi realizado em gel em condição desnaturante de poliacrilamida 12% (m/v). As amostras foram aquecidas por 5 min a 95 °C e com isto as proteínas são desnaturadas e ficam carregadas negativamente por ficarem associadas ao SDS. O sistema foi incubado por 90 minutos a 100 V e corrente de 20 mA, em temperatura ambiente, utilizando o sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad). Tendo como tampão de corrida 50 mM Tris-HCl; 150 mM Glicina e 0,1% (p/v) SDS. Após o término da corrida, os géis foram corados com solução de Coomassie (metanol 40% (v/v); ácido acético glacial 10% (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (m/v)) por uma hora e descorados em solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) por aproximadamente três horas.

4.4.10 Atividade amilolítica

A quantificação da atividade amilolítica foi realizada incubando-se 10 µL de extrato enzimático com 90 µL de solução de amido 10 g/L por 15 minutos a 40 °C (RIAZ *et al.*, 2007). Após o tempo reacional, os tubos foram incubados por 5 min a 100 °C, de forma a inativar as enzimas. Adicionou-se então 1,0 mL de reativo enzimático GOD-POD e as soluções foram incubadas por mais 10 min a 40 °C. Por fim, as absorvâncias a 505 nm foram registradas. Cada análise foi realizada em triplicata.

Uma unidade de atividade (U) foi expressa como a quantidade de enzima necessária para catalisar a liberação de 1 µmol de glicose por minuto de reação nas condições descritas. A atividade enzimática pode ser calculada pela Equação 4.1. A curva padrão envolvida nessa metodologia foi construída utilizando-se soluções de glicose em quantidades entre 0 e 0,185 µmols.

$$\text{Unidade de atividade}(U) = \frac{\mu\text{mol de glicose}}{\text{tempo (min)}} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Em que: *µmols de glicose* correspondem à quantidade de glicose produzida. E o tempo de reação enzimática que foi de 15 minutos. A diluição da amostra em tampão universal pH 5,0, imposta previamente à análise, foi considerada no cálculo de atividade.

4.4.11 Atividade celulolítica

Para a quantificação da atividade celulolítica, em cada tubo foi adicionado 10 µL da amostra com 90 µL da suspensão de CMC 20 g/L e incubado por 10 minutos a 40 °C. Em seguida as enzimas foram inativadas a 100 °C durante 5 minutos. Adicionou-se 1,0 mL do reativo de GOD-POD e novamente levou-se ao banho de 40 °C por 10 minutos. Por fim, as leituras de absorvâncias foram obtidas a 505 nm. Cada análise foi realizada em triplicata. As curvas de calibração e a definição de atividade enzimática foram as mesmas que as usadas para quantificação amilolítica (Equação 4.1).

Em que: *µmols de glicose* correspondem à quantidade de glicose produzida nas condições descritas e o tempo de reação enzimática que foi de 10 minutos. A diluição

da amostra em tampão universal 120 mM e pH 5,0, imposta previamente à análise, foi considerada no cálculo de atividade.

A suspensão de CMC (Sigma–Aldrich), na forma de sal de sódio, foi preparada em tampão universal pH 5,0 em uma concentração de 20 g/L (GHOSE, 1987). Para a quantificação enzimática foi utilizado o CMC de média viscosidade. A solução foi estocada a 4 °C.

4.4.12 Atividade xilanolítica

Para a quantificação da atividade xilanolítica, 10 µL da amostra foi incubado com 90 µL da solução de xilana 10 g/L a 40 °C. Após 5 minutos de reação, foram adicionados 300 µL do reagente DNS e as enzimas foram inativadas submetidas a 100 °C por 5 minutos. Finalmente, adicionou-se 1,0 mL de água destilada e a absorvância foi medida a 540 nm. Uma unidade (U) de atividade xilanolítica foi expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcares redutores totais por minuto de reação nas condições descritas e a curva padrão foi realizada com xilose (Sigma). A atividade enzimática pode ser calculada pela Equação 4.2.

$$\text{Unidade de atividade}(U) = \frac{\mu\text{mol de xilose}}{\text{tempo (min)}} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

A xilana de *Birchwood* (Sigma–Aldrich) foi pesada e dissolvida em tampão universal pH 5,0 em uma concentração de 10 g/L. Sua solubilização foi realizada por agitação e aquecimento (BAILEY *et al.*, 1992). A solução foi estocada a 4 °C.

4.4.13 Atividade proteolítica

A determinação da atividade proteolítica foi realizada incubando-se 50 µL de extrato enzimático com 500 µL da solução de azocaseína (0,5 % (m/v)) por 5 minutos a 40 °C. Imediatamente após esse tempo as enzimas foram inativadas adicionando 1 mL da solução de HCL 1M. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 11000 g. As absorvâncias dos sobrenadantes foram lidas a 345 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para promover o aumento de

uma unidade de absorvância (345 nm) por minuto de reação, conforme mostrado pela Equação 4.3. Para os brancos das análises, foi adicionado 1 mL da solução de HCL 1M antes da adição da solução de azocaseína.

$$\text{Unidade de atividade}(U) = \frac{abs_{345nm}}{\text{tempo (min)}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Em que: *abs* corresponde aos valores de absorvância observados na análise nas condições descritas e o tempo de reação enzimática que foi de 5 minutos. A diluição da amostra em tampão universal pH 5,0, imposta previamente à análise, foi considerada no cálculo de atividade.

Padrão de azocaseína foi preparado com 0,5 g de azocaseína (Sigma–Aldrich) e dissolvido em 15 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado 5 mL de solução 0,2N de NaOH com agitação até a dissolução completa. Por fim, foi adicionado tampão universal (pH=5,0) em balão de vidro, até 100 mL. O padrão foi estocado no máximo uma semana a 4 °C.

4.4.14 Quantificação de levedura

A quantificação de células de levedura foi realizada com a retirada de alíquotas do sistema reacional, sendo centrifugadas a 10 000 g por 10 minutos. As quantificações de biomassa foram realizadas em espectrofotômetro, com absorvância em 600 nm de comprimento de onda. A relação entre absorvância e concentração celular foi obtida através de uma curva de peso seco das células.

A curva de peso seco de células foi realizada, após a remoção de um volume de 10 mL de meio com células e filtração em membranas de acetato de celulose (Millipore) de 0,45 µm. A biomassa celular retida na membrana passou por secagem a 105 °C e medida sua massa seca (MX-50, AND).

4.4.15 Concentração de farinha em base seca

Para cálculo de concentração de farinha seca inicial fez-se a medição da densidade da suspensão de farinha de babaçu no sistema reacional para cada uma das concentrações iniciais utilizadas. E pode então ser calculada pela Equação 4.2 a seguir.

$$\text{Concentração em base seca (g/L)} = \frac{\text{massa de farinha (g)} \times (1 - \text{umidade})}{\text{massa do sistema (g)} / (\text{densidade (g/mL)})} \times 1000 \left(\frac{\text{mL}}{\text{L}} \right)$$

(Eq. 4.2)

Sendo a umidade representada por umidade (%)/100. A densidade foi calculada pela relação da massa e volume dentro de uma proveta de vidro graduada, os valores foram expressos em g/mL.

4.5 Condução dos experimentos

4.5.1 Produção das enzimas (fermentação em estado sólido)

Esporos de células de *Aspergillus awamori* propagados por cinco dias em estufa a 30 °C em placa de *petri* com meio aveia (seção 4.3.2.1) foram ressuspensos assepticamente em água destilada estéril. Uma alíquota da suspensão obtida foi utilizada para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. De posse da concentração celular, adicionou-se o volume da suspensão necessário para se inocular uma concentração celular de $2,5 \times 10^5$ esporos/mL no meio malte líquido. Tal pré-inóculo foi mantido por 28 horas a 30 °C e agitação de 200 rpm, e os fungos propagados foram transferidos em uma proporção de 1,62 mL/g de matéria-prima, sendo um volume de líquido suficiente para garantir 62 % de umidade inicial na torta de babaçu (menor do que 14 *mesh*). Para esses experimentos foram utilizados biorreatores cilíndricos (Bécheres de polipropileno) de volume de 600 mL ou bandejas de vidro (Pyrex). Depois de inoculado, a FES transcorreu por 120 horas a 23 °C, e saturação da umidade controlada em 95%, mantida em estufa umidificada. Os experimentos conduzidos em bandejas tipo Pyrex foram realizados em escala 13 vezes maior em massa de torta de babaçu, respeitando a mesma altura do leito sólido.

Para a extração das enzimas, esta foi realizada com água destilada 10:1 em relação à massa inicial de torta, seguindo-se de maceração da matéria-prima fermentada e transferência para frascos cônicos de vidro. O sistema foi então colocado sob agitação orbital de 200 rpm por 30 minutos, a 37 °C. As amostras foram centrifugadas a 11 000 g por 20 min a 15 °C, alíquotas dos sobrenadantes estocados a

4 °C até serem analisadas, e o restante liofilizado, embalado à vácuo e mantido a -20°C.

4.5.2 Enzimas comerciais

Foi utilizada a enzima comercial Stargen™ 002 (*Granular Starch Hydrolyzing Enzyme*), fornecidas pela Genencor International. O preparado comercial Stargen™ 002 contém α -amilase de *Aspergillus Kawachi* e glucoamilase de *Trichoderma reesei*, possui a capacidade de atuar sobre o amido granular, e foi escolhido, com o objetivo de comparar sua eficiência com a do preparado enzimático próprio (produzido por FES).

4.5.3 Reações de hidrólise do amido granular

O principal objetivo desta etapa foi de investigar a capacidade de hidrólise das enzimas próprias e comerciais sobre amido na forma granular, em baixas temperaturas. A etapa de hidrólise inicial, Pré-Sacarificação, ou ainda Pré-SSF, busca o desenvolvimento de uma etapa anterior ao início do processo de Sacarificação Simultânea a Fermentação (SSF), como tratamento inicial visando uma rápida hidrólise e liberação de glicose, conforme já discutido na seção 3.4.4. Para este fim, fez-se um estudo sobre as principais variáveis que influenciam a atividade e estabilidade enzimática durante a etapa de hidrólise.

Pensando na economicidade do processo como um todo, buscou-se conduzir o processo num tempo curto (máximo de 6 horas) e em temperatura um pouco mais elevada, mas ainda inferior ao da temperatura de gelatinização do amido. Outro fator empregado visando à redução dos custos do processo foi a utilização de meio aquoso (não tamponado) sem esterilização prévia.

Como a finalidade principal desta etapa, foi idealizada para preceder etapa de SSF, após esse tempo de hidrólise inicial, a temperatura do sistema reacional foi reduzida para uma nova temperatura constante de 32 °C.

Para atingir a atividade amilolítica desejada em cada tipo de experimento, na maior parte dos casos, foi necessário concentrar o extrato enzimático. Para tal, após a liofilização do extrato, este foi ressolubilizado em água, em diferentes concentrações de forma a atingir a atividade necessária.

Amostras representativas das reações foram recolhidas em diferentes intervalos de tempo, sendo centrifugadas a 10 000 g por 10 min para recolher o sobrenadante. Em seguida a amostra era submetida a 100 °C por 5 min para inativação das enzimas e assegurar o término da reação. As amostras foram armazenadas a 4 °C, para o acompanhamento do teor de glicose.

4.5.3.1 Ensaios preliminares de hidrólise do amido granular da farinha de babaçu

Os extratos enzimáticos obtidos durante as fermentações foram aplicados na hidrólise da farinha de babaçu. Para tal, adicionou-se 24 mL de solução de extrato enzimático, de forma a garantir a atividade de 20 U/mL, a 4,8 g de matéria-prima com 11% de umidade (160 g/L de farinha seca). Os ensaios foram realizados em pequenos frascos cônicos de vidro (frascos tipo *erlenmeyer*) ou em tubos plásticos (tubos tipo *falcon*). O pH das suspensões foi ajustado para 5,0 com ácido sulfúrico. Os testes de hidrólise foram conduzidos em banho térmico a 50 °C com agitação orbital a 200 rpm. Após as 4 horas de hidrólise inicial o sistema foi resfriado para 32 °C. Foram realizados ensaios controle negativo, que foram conduzidos nas mesmas condições das amostras, apenas substituindo-se os 24 mL de extrato enzimático por 24 mL de água destilada. Nos ensaios de comparação com o produto comercial STARGEN™002, foi utilizado uma carga do preparado enzimático de 1,2g/kg_{MP} (valor de carga recomendada pelo fabricante).

Posteriormente, o experimento com extrato enzimático (20 U/mL) foi realizado (alterando-se a forma de agitação) em frasco cônico de vidro com agitador magnético com 160 g/L de farinha seca, pH=5,0 e nas mesmas condições de temperatura das descritas acima.

4.5.3.2 Investigação das variáveis na hidrólise do amido granular

Foi realizado um planejamento experimental fatorial 2² com pontos centrais (2 fatores, 2 níveis e 3 pontos centrais), empregado para estudar a influência da carga enzimática (ou expresso por atividade enzimática em U/mL) e concentração de farinha ((m/m) em base úmida), ou expresso em base seca (g/L), na hidrólise do amido granular da farinha de babaçu. Para este conjunto de experimentos, foram utilizadas ferramentas estatísticas para a análise dos resultados experimentais obtidos. Para tal,

utilizou-se o *software* Statistica 7.0. Os efeitos lineares, e a interação das variáveis dos planejamentos foram estimados e utilizados na construção de modelos matemáticos. Os erros experimentais foram estimados pela repetição dos pontos centrais.

Os experimentos de hidrólise foram realizados em temperatura inicial constante de 50°C, usando um controlador de temperatura e aquecedor em um banho de água, e depois de 6 horas, diminuindo-se para 32 °C para o restante da reação.

O extrato enzimático liofilizado foi utilizado em diferentes atividades amilolítica (4,5 a 45 U/mL) nesses experimentos de hidrólise. Estas suspensões foram ajustadas para pH 4,8 com ácido sulfúrico, quando necessário, tendo em vista que o pH inicial do extrato de enzima obtido encontra-se na faixa de 4,8-5,5. A farinha de babaçu foi adicionada em concentrações 126-236 g/L (em base seca), e a hidrólise foi realizada em pequenos reatores de 100 mL. A mistura foi realizada por meio de agitadores magnéticos, garantindo boa homogeneidade do sistema reacional. Amostras da mistura de reação foram centrifugadas a 10 000 g por 10 min para acompanhamento da produção de glicose.

4.5.3.3 Estudo do efeito da temperatura na hidrólise do amido granular

Os experimentos de hidrólise foram realizados em diferentes temperaturas constantes (30°C, 32°C, 40°C, 50°C e 60°C), usando um controlador de temperatura e aquecedor sobre um banho de água. As variáveis, atividade amilolítica (20 U/mL) e concentração de substrato (190 g/L de farinha de babaçu, em massa seca) foram mantidas iguais esses experimentos. O pH foi mantido em 4,8, também houve adição de azida de sódio (0,2 g/L) para evitar a contaminação. Em diferentes intervalos de tempo foram removidas alíquotas do sistema reacional para quantificação de glicose, as amostras foram centrifugadas a 10 000 g por 10 min. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.5.3.4 Avaliação de estratégias de hidrólise

Parte dos experimentos de hidrólise foi realizada em temperatura inicial constante de 40° ou 50 °C, usando um controlador de temperatura e aquecedor em um banho de água, e depois de 4 ou 6 horas (a depender do experimento) diminuindo-se para 32 °C para o restante da reação (entre 24 e 72 h).

O extrato enzimático liofilizado foi utilizado com atividade amilolítica de 20 U/mL para estes experimentos de hidrólise. A farinha de babaçu foi adicionada em concentrações 190 g/L (em base seca), a hidrólise foi realizada em pequenos reatores de 100 mL com as suspensões em pH 4,8 com ácido sulfúrico. A mistura foi realizada por meio de agitadores magnéticos, e a fim de prevenir contaminações, com crescimento microbiano, foi adicionada uma solução concentrada de azida sódica, de forma que a concentração final no sistema fosse de 0,2 g/L. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, a exceção do experimento de desempenho do extrato enzimático por 72 h que foi realizada em triplicata.

4.5.3.5 Hidrólise de milho

Os extratos enzimáticos obtidos durante as fermentações e o produto comercial STARGEN™ 002 foram aplicados na hidrólise da farinha de milho (Yoki). Para tal, adicionou-se 3,0 g de matéria-prima com 12,6 % de umidade (190 g/L de farinha seca) em 12 mL do sobrenadante, em pequenos frascos cônicos de vidro em banho com temperatura controlada. O pH das suspensões foi ajustado para 4,8 com ácido sulfúrico. Após as 4 horas de hidrólise inicial a 50 °C o sistema foi resfriado para 32 °C e assim por mais 68 h. Foram realizados ensaios controle negativo, que foram conduzidos nas mesmas condições das amostras, apenas substituindo-se os 12 mL de enzima por 12 mL de água. Foi utilizada uma atividade amilolítica de 20 U/mL com extrato enzimático e com Stargen™002 (o que representa um valor de carga inclusive acima da sugerida pelo fabricante). Os experimentos foram realizados em duplicata.

A farinha de milho amarela comercial (Yoki) apresenta uma composição segundo o fabricante apresentada na Tabela 4.2. Apenas a umidade foi calculada em laboratório, valor sobre a massa total (portanto base úmida). Para sua utilização devido à característica da farinha em flocos, foi realizada uma leve maceração com pistilo de porcelana, e em seguida peneirada obtendo-se partículas menores que 28 mesh Tyler (0,595 µm), apenas uma remoção de partículas mais grosseiras. Tal faixa de granulometria de milho amarelo utilizado foi a mesma utilizada por WANG *et al.* (2007) nos experimentos de hidrólise e produção de etanol.

Tabela 4.2: Composição da Farinha de milho amarela (Yoki)

Componentes	Teor em massa (%)
Umidade (base úmida)	12,6
Amido (base seca)	82,0
Proteína (base seca)	7,4
Fibras (base seca)	5,2
Gordura (base seca)	2,0
Outros (base seca)	3,4

4.5.4 Produção de etanol

4.5.4.1 Avaliação da capacidade fermentativa das cepas de levedura

A cepa industrial JP1, após ser propagada por 18 h, foi transferida para diferentes meios de fermentação em 10 % em relação ao volume final de reação. As composições dos meios foram de: 20, 35 e 50 g/L de glicose; 10, 20, 25, 30 e 50 g/L peptona; e 5, 10, 12,5, 15 e 25 g/L extrato de levedura. A fermentação foi mantida a 32 °C com agitação orbital de 120 rpm por até 72 h.

Estudos de fermentação com a cepa JP1 em meio (35 g/L de glicose, 30 g/L peptona e 15 g/L de extrato de levedura) foram realizados em duas diferentes condições, em frascos com rolha vazada (com algodão e gaze) ou frascos com sistema de vedação de entrada de ar (*air lock*). A fermentação foi mantida a 32 °C com agitação orbital de 170 rpm por até 72 h.

Testes com diferentes linhagens, as cinco recombinantes mais a JP1, foram realizados a partir da fermentação em meio amido: meio YPS10 (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 100 g/L amido solúvel P.A.) em pH=5 ajustado com ácido sulfúrico (adaptado de ALTINTAŞ *et al.*, 2002). O inóculo propagado por 24 h foi transferido para este meio em 20 % em relação ao volume final de reação. A fermentação foi mantida a 30 °C com agitação orbital de 150 rpm por até 72 h.

4.5.4.2 Avaliação de estratégias de SSF

As estratégias adotadas para o desenvolvimento do processo de produção de etanol por SSF encontram-se descritas a seguir:

Estratégia I – Os extratos enzimáticos liofilizados (ou Stargen™) foram dissolvidos em água e em seguida, aplicados para iniciar a hidrólise da farinha de babaçu (ou milho). Para tal, foi adicionada a solução de enzima na farinha com 11% de umidade (de forma a garantir 190 g/L de farinha seca e 20 U/mL de atividade amilolítica). A hidrólise foi iniciada em pequenos reatores de 100 mL em banho térmico a 50 °C e a mistura foi realizada por meio de agitadores magnéticos, garantindo boa homogeneidade do sistema reacional. O pH das suspensões foi ajustado para 4,8 com ácido sulfúrico para o experimento com Stargen™002. Após 4 h de hidrólise inicial (pré-SSF), o inóculo das cepas de levedura, JP1 ou A2, propagados por 18 h e 24 h, respectivamente, foram transferidos para este meio de hidrólise assim que a temperatura alcançasse 32 °C (em torno de 20 min). O sistema *air lock* foi aplicado sobre estes frascos de reação. O meio contendo as células propagadas inoculou o meio de fermentação com 10 % em relação ao volume final, ficando entre 3,0 e 5,0 g/L de massa seca de levedura. O processo de SSF, após adição do inóculo, seguiu por até 72 h.

Para o experimento realizado com o Stargen™ 002 foi necessária adição de fonte de nitrogênio, diferentemente do que ocorre com o extrato que contém considerável teor de FAN. Para tal, foram utilizados peptona (15 g/L) e extrato de levedura (7,5 g/L) de forma a garantir o mesmo valor de FAN do que nos demais experimentos com o extrato enzimático (aproximadamente 800 mg/L), conforme previamente calculado e quantificado.

Segundo o fabricante a fonte adicional de nitrogênio deve realmente ser fornecida, claro que industrialmente esta fonte provém de algum sal inorgânico de amônia de baixo custo ou uréia. Neste caso utilizou-se uma fonte rica de nitrogênio e de alto custo apenas para fins comparativos, garantindo que o produto comercial estaria nas mesmas bases comparativas do extrato enzimático próprio.

Estratégia II – Para esta estratégia foi utilizado um inóculo mais alto de levedura (nove vezes maior que o anterior) e uma hidrólise inicial mais longa com 4 h a 50 °C e 44 h a 32 °C e uma etapa de SSF mais curta após esse tempo, durando no máximo 24 h. Os ensaios foram realizados com as cepas JP1 e A2, e apenas sobre a farinha de babaçu.

Estratégia III – Mesma descrição da estratégia I, porém sem as 4 h de pré-SSF, ou seja, os experimentos foram realizados por todo o tempo a 32 °C. Os ensaios foram realizados com as cepas JP1 e A2, e apenas sobre a farinha de babaçu. Com a cepa A2 foi realizado ainda, um experimento sem a adição de extrato enzimático, para avaliar a capacidade desta cepa na hidrólise e fermentação do amido granular. Neste caso, não havendo o extrato enzimático, não há fonte de nitrogênio também, portanto, foi necessário o uso de adição de peptona e extrato de levedura conforme descrito para Estratégia I com Stargen™.

Estratégia IV – Também chamado de: teste com batelada alimentada. A condução segue a mesma descrição em estratégia I, contudo, com 4 alimentações de 10 % cada, de farinha de babaçu em relação à sua massa inicial. As adições foram realizadas nos tempos de 1 h, 2 h e 4 h de pré-SSF e em 24 h de fermentação. Realizado apenas com a cepa JP1 e com a farinha de babaçu.

4.5.4.3 Processo SHF

Neste processo as etapas de hidrólise (sacarificação) e fermentação (produção de etanol) são separadas. Foi realizada nas mesmas condições, com o extrato enzimático (20 U/mL) e de farinha de babaçu (190 g/L), das descrições anteriores, porém, o meio de hidrólise permaneceu por 24 h a 50 °C. Ao final desta hidrólise foi centrifugado a 11000 g em condições estéreis, seguido de uma filtração a vácuo (com membrana de 0,45 µm) e transferido novamente para o sistema de reação, onde o inóculo de JP1 propagado por 18 h foi transferido. O processo de fermentação, após adição do inóculo, seguiu por até 72 h.

Todos os experimentos de SSF e SHF foram realizados em duplicata. Todas as barras de erro presentes nos gráficos correspondem a uma unidade de desvio padrão.

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fim de observar e avaliar o efeito das enzimas sobre a superfície dos grânulos de amido a técnica de MEV foi utilizada.

As amostras de grânulos de amido de babaçu após o tratamento enzimático foram lavadas com água destilada duas vezes, desidratadas com etanol e, em seguida,

lioofilizadas. O pó de amido seco foi colocado em uma placa de metal e coberto com uma camada de 30 nm de ouro usando um modelo JFC-1500 (JEOL Co., Ltd.) em um ambiente com gás argônio. As amostras foram, então, examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (modelo Quanta 200, FEI Company). Múltiplas micrografias de cada amostra foram examinadas em diferentes ampliações. Experimentos de controle foram submetidos ao mesmo tratamento descrito anteriormente, porém, com água destilada ao invés de extrato enzimático. O equipamento foi ajustado para uma tensão de aceleração do feixe de elétrons de 20 kV. As imagens foram realizadas no Laboratório de Processos com Membranas (PAM) da COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.7 Cálculo das variáveis de resposta

4.7.1 Parâmetros de crescimento celular

Os perfis cinéticos de crescimento de células de levedura foram ajustados ao modelo logístico de crescimento microbiano (PEARL, 1927), que é apresentado na Equação 4.3 em sua forma diferencial. Após integração considerando tempo inicial igual a zero (Eq. 4.4), foi utilizada para a regressão não linear, realizada pelo uso da ferramenta Solver do *software* Microsoft Excel® 2007, através da minimização da função (Eq. 4.5).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}} \right] \quad (\text{Eq. 4.3})$$

$$X = \frac{X_{\text{máx}}}{1 + \frac{X_{\text{máx}} - X_0}{X_0} e^{-\mu \cdot t}} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Em que: μ : Taxa específica de crescimento (h^{-1}); X_0 : Concentração inicial de células (g/L) ($t = 0$ h); X : Concentração de células em diferentes tempos t de crescimento; $X_{\text{máx}}$: Concentração máxima células (g/L) predita.

$$f(x, y) = \sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2 \quad (\text{Eq. 4.5})$$

Para o cálculo do tempo de duplicação de levedura (ou tempo de geração), t_d , foi calculado conforme a Equação 4.6.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

4.7.2 Eficiência de hidrólise

A eficiência de hidrólise, ou conversão de hidrólise, foi calculada através da Equação 4.7.

$$\text{Eficiência de Hidrólise (\%)} = \frac{\left(\frac{162}{180}\right) \times (\text{Glicose}_{\text{final}} - \text{Glicose}_{\text{inicial}}) (\text{g/L}) \times 100}{\text{Concentração de farinha (g/L)} \times \text{Teor de amido (\%)}} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Esta equação na prática é a mesma apresentada anteriormente (Eq. 3.1), e a explicação dos termos e coeficientes, consta na seção 3.4.4.

4.7.3 Taxa inicial de hidrólise

A taxa inicial de hidrólise corresponde à taxa inicial constante de produção de glicose, em que a concentração do produto varia linearmente com o tempo. Quando haviam ao menos 4 pontos experimentais nessa região (até 2 horas), a taxa foi determinada por regressão linear. Em outros casos, foi calculada pela Equação 4.8, apresentada a seguir:

$$\text{Taxa inicial de hidrólise} = \frac{P_i - P_0}{t_i} \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Em que:

Taxa inicial de hidrólise em g/(L.h);

P_i : Concentração de glicose (g/L) no tempo t_i de hidrólise;

P_0 : Concentração de glicose (g/L) no início da hidrólise;

t_i : Tempo de hidrólise (horas). Foi utilizado um tempo de no máximo até 2 horas.

4.7.4 Produtividade

A produtividade da produção de etanol, durante os experimentos de hidrólise e fermentação, foi calculada pela Equação 4.9, apresentada a seguir:

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

Em que:

Q_P : Taxa de produtividade (g/(L.h));

P_f : Concentração do produto (g/L) no tempo t_f de reação;

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

t_f : Tempo de fermentação (horas).

4.7.5 Rendimento

O cálculo do rendimento de substrato em produto foi efetuado utilizando-se a Equação 4.10, mostrada a seguir.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{Eq. 4.10})$$

Em que:

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

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

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

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

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

4.7.6 Eficiência de fermentação

A eficiência de fermentação alcoólica pode ser obtida pelo rendimento de glicose em etanol sobre o rendimento máximo (0,511). Conforme mostrado pela Equação 4.11.

$$\text{Eficiência de fermentação (\%)} = \frac{(\text{Etanol}_{\text{final}} - \text{Etanol}_{\text{inicial}}) \times 100}{(\text{Glicose}_{\text{inicial}} - \text{Glicose}_{\text{final}}) \times 0,511} \quad (\text{Eq. 4.11})$$

Em que, etanol e glicose estão expressos em g/L.

4.7.7 Eficiência do processo

A eficiência do processo de Sacarificação e fermentação simultânea, ou eficiência de conversão do amido em etanol, pode ser obtida pelo produto da eficiência de hidrólise pela eficiência de fermentação. Pode ser representada pela Equação 4.12.

$$\text{Eficiência do processo (\%)} = \left(\frac{162}{180} \right) \times \frac{(\text{Etanol}_{\text{final}} - \text{Etanol}_{\text{inicial}}) \times 100}{(\text{Amido}_{\text{inicial}} - \text{Amido}_{\text{final}}) \times 0,511} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

Em que, etanol e glicose estão expressos em g/L e os fatores (162/180) e 0,511 foram anteriormente explicados.

4.7.8 Testes estatísticos

Para o cálculo dos desvios-padrão das médias dos dados obtidos experimentalmente, a Equação 4.13 foi utilizada. E o teste t de *Student* foi calculado pela Equação 4.14.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Eq. 4.13})$$

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_x}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} \quad (\text{Eq. 4.14})$$

Em que: σ representa desvio padrão (na mesma unidade do valor médio); x_i : cada valor de réplica da análise; \bar{x} : valor médio das análises; n : número de réplicas da análise; μ_x intervalo de confiança dos valores médios de x ; e t representa o valor tabelado da distribuição de "t" Student, para *p-valor* de 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os principais resultados obtidos neste trabalho, bem como suas respectivas discussões, levando-se em conta os fenômenos observados e os dados reportados na literatura.

Dentro de um conceito de biorrefinaria, o hidrolisado de farinha de babaçu pode levar à obtenção da glicose, uma molécula chave para os processos biotecnológicos. A partir de diversos processos de fermentação com bactérias, fungos e leveduras, com esta molécula, torna-se possível a obtenção de uma ampla variedade de produtos químicos de maior valor agregado. Conforme anteriormente relatado, o presente trabalho focou apenas na produção de um destes produtos químicos – o etanol.

A fim de uma visualização mais holística do processo, foi elaborado um diagrama esquemático de uma biorrefinaria potencial integrada, baseada na utilização do coco de babaçu (Figura 5.1).

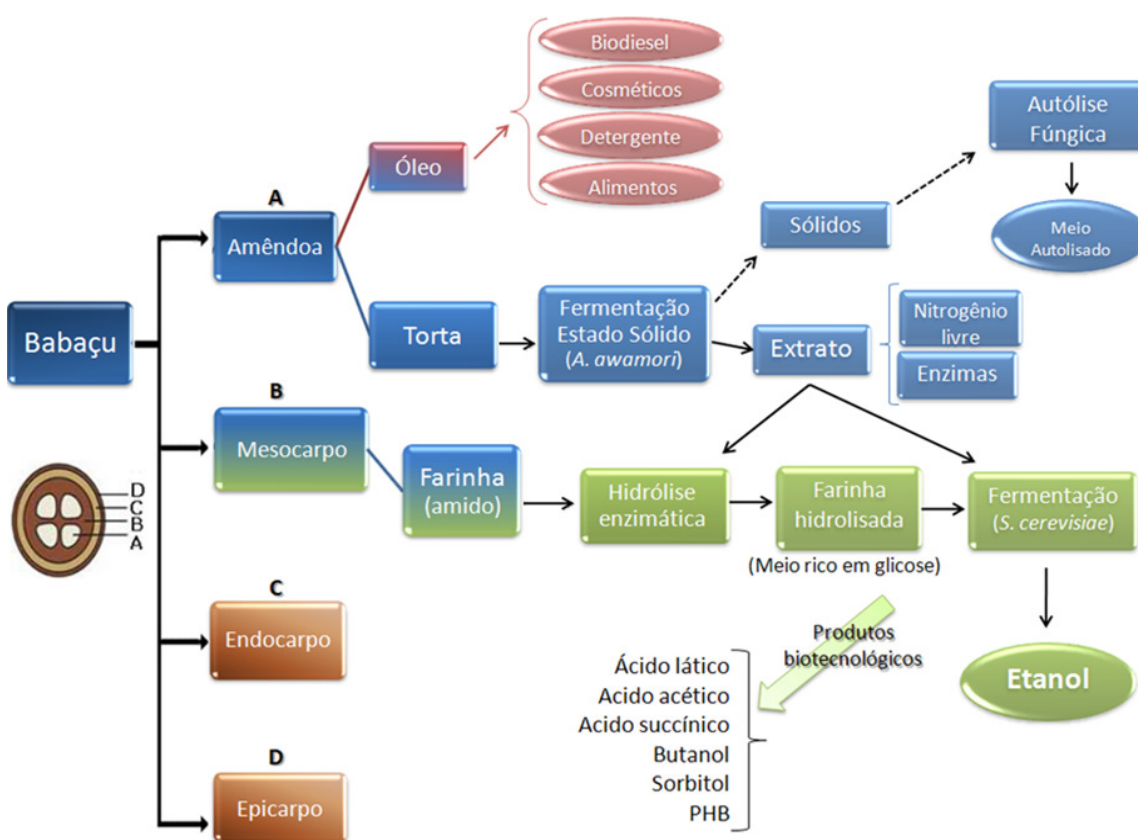


Figura 5.1: Diagrama de potencial biorrefinaria integrada baseada na utilização do babaçu.

O diagrama apresenta o coco de babaçu dividido em suas quatro frações, de dentro para fora do fruto: amêndoa, mesocarpo, endocarpo e epicarpo. Apesar da possibilidade de utilização do babaçu em diversas formas e em diversos processos industriais, conforme demonstra a Figura 5.1, é a amêndoa que possui maior importância econômica atualmente. Da amêndoa segue a seção vermelha, a oleoquímica do babaçu. Esta já é existente e movimenta o cultivo do babaçu, sendo, portanto, o óleo de babaçu o produto mais importante hoje em dia. Em azul tem-se o resíduo deste processo, a torta da amêndoa do babaçu, a partir da qual será produzido neste trabalho o extrato enzimático por Fermentação em Estado Sólido (FES), que além de todo um complexo enzimático produz, ainda, um alto teor de aminoácidos (nitrogênio livre). As enzimas serão aplicadas neste trabalho sobre a farinha do mesocarpo do coco do babaçu (seção verde). A partir da hidrólise do amido da farinha poderá ser obtido um meio com elevada concentração de glicose (produto de hidrólise) e alto teor de nitrogênio (proveniente do extrato da FES). Com este meio de cultivo e nas condições ideais, as leveduras podem converter esta glicose em etanol. Ao invés do etanol, outros produtos poderiam ser produzidos a partir deste ponto, constituindo uma lista de exemplos de produtos de interesse tecnológico, a depender do interesse do mercado. Por fim, a seção marrom representa o endocarpo e o epicarpo do coco do babaçu. Apesar de não listadas, estas duas frações podem ser utilizadas para gerar gases combustíveis, carvão ativado, coque e piche, além de outros compostos como acetatos, metanol e fenol (DESER, 2007). Na seção azul, existe, ainda, em linha pontilhada, uma potencial utilização do resíduo da FES – a fração sólida resultante da extração. Estes sólidos poderiam ser submetidos a condições de lise celular (para eliminação dos fungos filamentosos presentes), chamada de autólise fúngica, em que se poderia obter um produto com elevados teores de proteína, aminoácidos e, ainda, alguns açúcares. Esta linha não consta no escopo deste presente trabalho.

O diagrama apresenta o etanol como o produto final da fermentação, no entanto, para obtenção deste, faz-se necessário uma etapa de recuperação (não indicada na Figura 5.1). Nesta etapa existe a possibilidade de obtenção de um

subproduto sólido, equivalente ao “DDGS” do processo de milho. Investigações sobre esta fração também não foram realizadas neste estudo.

5.1 Caracterização da matéria-prima

A principal matéria-prima utilizada neste trabalho foi a farinha do coco de babaçu. A partir dos componentes deste resíduo vegetal, proveniente de um processamento industrial, buscou-se obter os nutrientes necessários para o desenvolvimento de um bioprocessamento. Desta forma, a Tabela 5.1 apresenta os resultados da caracterização parcial da farinha de babaçu com relação aos teores de umidade (calculado sobre a matéria bruta, ou seja, representado em base úmida), bem como teores em base seca de amido, proteína, hemicelulose, celulose e lignina. A matéria-prima foi recebida com teor de umidade de $(11,06 \pm 0,68)$ %, calculado através de 10 réplicas. Os erros indicados representam uma unidade de desvio padrão. As demais análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 5.1: Composição da Farinha de babaçu.

Componente	Teor em massa (%)
Umidade (base úmida)	$11,06 \pm 0,68^a$
Amido (base seca)	$60,05 \pm 1,37$
Proteína (base seca)	$2,98 \pm 0,08$
Hemicelulose (base seca)	$7,94 \pm 0,27$
Celulose (base seca)	$13,53 \pm 0,31$
Lignina (base seca)	$15,79 \pm 0,32$

^a Desvio padrão de 10 réplicas

Conforme apresentado na Tabela 5.1, o amido é o principal componente da farinha (cerca de 60 %). O elevado teor de amido torna a farinha de babaçu uma excelente fonte amilácea, justificando o interesse por esta matéria-prima e apresentando assim, um grande potencial para a sua hidrólise por enzimas amilolíticas, propiciando uma excelente fonte de carbono para diversos microrganismos.

Outro componente importante para o processo trata-se da proteína, porém esta se apresenta em pequena quantidade, representando apenas cerca de 3 % da massa da farinha. Comparado aos valores encontrados de composição da farinha de

babaçu da literatura, os conteúdos de amido e proteína foram próximos aos relatados por BARUQUE FILHO *et al.* (2000), que obtiveram valores em base úmida que, convertidos para base seca, equivaleriam a 58 % de amido e 2,68 % de proteína. Com relação às fibras, os valores divergem um pouco: foi obtido que o teor de fibras incluindo hemicelulose, celulose e lignina, somaria mais de 26 %, enquanto BARUQUE FILHO *et al.* (2000) reportaram aproximadamente 15 % de fibras na farinha de babaçu.

Existem poucas publicações sobre as propriedades da farinha babaçu, todavia, no trabalho de ALMEIDA *et al.* (2011) foram reportados teores, em massa seca, de 64 % de amido, 2,4 % de proteína e 9,7 % de fibras. Mais uma vez os valores de teores de amido e proteína obtidos no presente trabalho foram relativamente próximos aos da literatura.

Outras informações obtidas, referentes à farinha de babaçu, foram: o teor de glicose livre presente na matéria-prima, que foi de 0,21 % (m/m); e as densidades das suspensões formadas com as diferentes concentrações de farinha de babaçu utilizadas, que variaram entre 1,03 e 1,09 g/cm³.

A outra matéria-prima usada nos experimentos de hidrólise e fermentação, foi a farinha de milho amarela (Yoki), cuja informação de composição consta na seção 4.5.3.5.

5.2 Caracterização do extrato enzimático: Atividade enzimática

5.2.1 Produção das enzimas

O complexo enzimático produzido por fermentação no estado sólido (FES) através da linhagem de *A. awamori*, cultivada em torta de babaçu por 120 h, apresentou um teor de proteínas totais de 533,2 mg/L, quantificado pelo método de BRADFORD (conforme seção 4.4.8). O produto desta fermentação (extrato enzimático) foi analisado por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (Figura 5.2). Foi observado que o extrato enzimático bruto produzido apresenta diversas bandas em faixas com massas molares de 43 kDa até mais de 94 kDa. As bandas do padrão utilizado foram de 14 até 94 kDa.

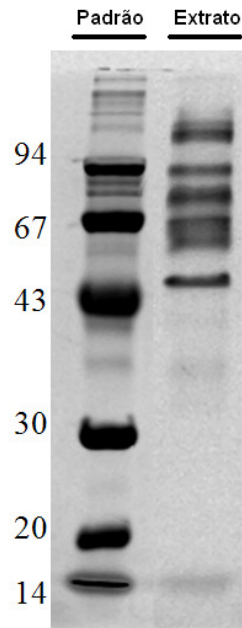


Figura 5.2: Gel de eletroforese (SDS-PAGE) do extrato enzimático. O padrão utilizado contém proteínas com massas molares de 94, 67, 43, 30, 20 e 14 kDa.

Pode-se observar, em especial, a presença de uma banda de proteína com menor massa e mais isolada, com aproximadamente 50 kDa. Outras bandas na faixa de 60-67 kDa, outras entre 70-94 kDa e outras com massas acima de 94 kDa foram também observadas. Os valores encontrados na literatura estão na mesma faixa obtida: DUBEY *et al.* (2000) reportaram em seu trabalho a produção de glucoamilase e α -amilase produzidas por *A. niger*, com uma massa de 71 kDa para glucoamilase e 53 kDa para α -amilase. Segundo o cálculo teórico realizado com o *software* EXPASY (2012), a massa molar das enzimas α -amilase e glucoamilase de *A. awamori* seriam de 54,9 kDa e 68,3 kDa, respectivamente. Portanto, as amilases (α -amilase e glucoamilase) estão presentes no gel provavelmente na faixa de massa molar com 50 kDa e entre 60-94 kDa. As outras bandas representam outras proteínas produzidas pelo fungo, dentre elas as outras enzimas amilolíticas, bem como as enzimas acessórias.

A fim de caracterizar as enzimas presentes no extrato produzido por FES, foi realizada uma quantificação das atividades das principais enzimas presentes. A Tabela 5.2 mostra os valores médios de atividade por volume (U/mL) e atividade específica (U/mg_{proteína}). Atividade por volume (U/mL) é uma medida de concentração da enzima de interesse por volume de extrato e a atividade específica, que também é uma

importante variável de resposta na análise de processos enzimáticos, está relacionada ao grau de pureza das enzimas de interesse, em relação ao total de proteínas presentes no extrato.

Tabela 5.2: Caracterização das enzimas presentes do extrato.

Enzimas	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg _{proteína})
Amilolíticas	5,38 ± 0,53	10,08 ± 0,99
Proteolíticas	0,84 ± 0,15	1,57 ± 0,28
Celulolíticas	0,67 ± 0,13	1,26 ± 0,24
Xilanolíticas	5,94 ± 0,71	11,14 ± 1,33

O objetivo dessa caracterização foi comprovar a capacidade de hidrólise do amido bem como comprovar a existência de enzimas acessórias neste complexo enzimático. Uma comparação entre as atividades não faz sentido, pois as definições de atividade de cada uma são distintas. A atividade amilolítica engloba a ação de todo o conjunto de amilases, pois foi quantificada através da conversão do amido solúvel em glicose. Com relação às enzimas acessórias, estão representadas pela quantificação das atividades das enzimas proteolíticas, celulolíticas e xilanolíticas, capazes de catalisar as reações de hidrólise de proteínas, celulose e xilana, respectivamente. O parâmetro de atividade amilolítica, expresso em U/mL, foi a principal variável enzimática utilizada nos experimentos de investigação de hidrólise.

5.2.2 Reprodutibilidade do processo de FES e estabilidade das enzimas produzidas

Com a finalidade de garantir uma equivalência entre as enzimas produzidas ao final de cada uma das fermentações (sobrenadante da extração com água), fez-se uma análise estatística das atividades amilolíticas das enzimas produzidas por cada uma das fermentações em estado sólido. A Figura 5.3 mostra a atividade amilolítica em U/mL para cada um dos extratos produzidos por FES nas mesmas condições. Para cada fermentação, têm-se quatro réplicas, e assim, foi calculado o teste t de *Student* para um nível de confiança de 95 %. O resultado mostra que as fermentações produzem extratos com atividades amilolíticas reprodutíveis, uma vez que as médias estão

dentro do intervalo de confiança, ou seja, todas as médias das atividades foram estatisticamente equivalentes. Deve-se considerar, ainda, que as fermentações de número 4, 5 e 6 foram realizadas em bandeja tipo Pyrex (maior escala), enquanto as anteriores (1, 2 e 3) foram realizadas em bécheres de polipropileno, mostrando também a reprodutibilidade das fermentações em diferentes escalas para produção das enzimas.

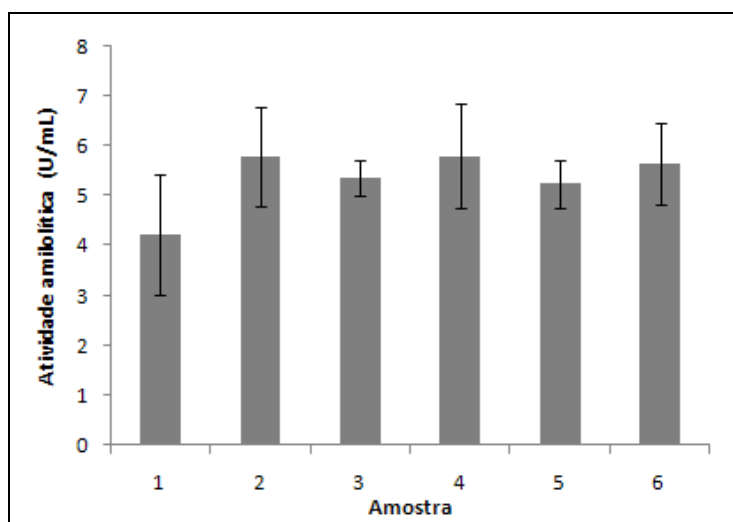


Figura 5.3: Teste t para os valores médios de atividades amilolíticas, calculado com nível de confiança de 95 %. Amostras de 1-6 correspondem aos extratos enzimáticos de suas respectivas fermentações.

Outro ponto importante está relacionado à estabilidade da atividade enzimática, relativa ao tempo de estocagem. Ao final de cada FES as enzimas foram extraídas com água e, após uma separação sólido-líquido, liofilizadas. As enzimas liofilizadas ficaram armazenadas a -20 °C, conforme sua necessidade de utilização. Para avaliação da estabilidade da atividade enzimática, após esse procedimento, foi realizado um teste t de *Student* com nível de confiança de 95 % sobre as médias de atividades após a extração da FES. Imediatamente após a liofilização (ressuspensão em um volume de água de forma a garantir a mesma concentração inicial), e após um e três meses de estocagem a -20 °C da amostra liofilizada, com ressuspensão em água no mesmo volume inicial (Figura 5.4).

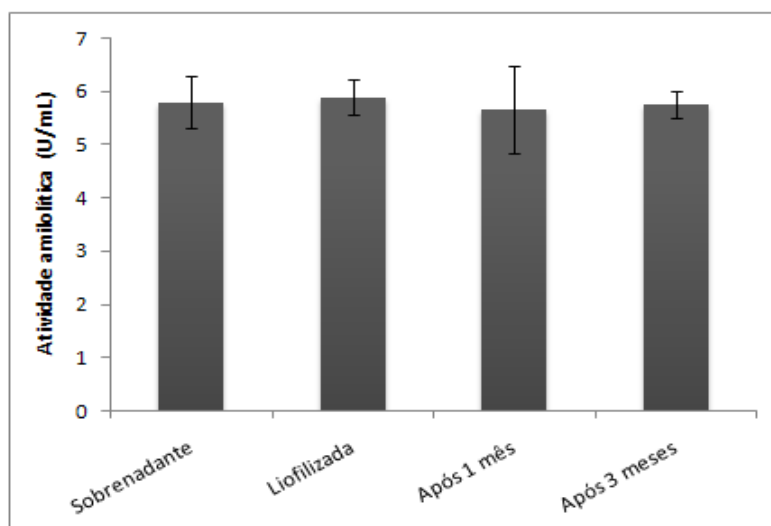


Figura 5.4: Estabilidade da atividade amilolítica presente no extrato após liofilização e estocagem.

O teste t mostra que as médias das triplicatas das atividades amilolíticas foram estatisticamente equivalentes, ou seja, não houve perda de atividade, mesmo após liofilização e armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por três meses, em comparação com o sobrenadante da extração (aproximadamente 1 h após o final da fermentação).

5.3 A hidrólise do amido granular

Todos os ensaios de hidrólise do amido granular foram idealizados com o intuito de preparar um meio de cultivo visando a etapa seguinte, de SSF (sacarificação e fermentação). Portanto, buscou-se investigar as condições e o tempo desta etapa de pré-SSF para produzir elevada concentração de glicose.

Com base em estudos reportados na literatura (WANG *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2010b), o complexo enzimático de degradação do amido apresenta atividade amilolítica ótima na faixa de pH próximo a 5,0 e temperatura em torno de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (RAMACHANDRAN *et al.*, 2004; RIAZ *et al.*, 2007). Assim, o estudo de reações de hidrólise começou com essa temperatura inicial, enquanto o pH foi considerado constante em todos os experimentos (entre 5,0 e 4,8). Desta forma, foi desenvolvida uma nova estratégia para a hidrólise do amido, com uma temperatura inicial constante de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, após esta primeira etapa do processo de hidrólise, foi então realizado um degrau na temperatura para $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, assim permanecendo até fim dos experimentos. O

tempo de duração desta etapa de pré-SSF (ou hidrólise inicial) variou ao longo dos diferentes experimentos. O termo “pré-SSF” será utilizado mesmo sem que haja a etapa de fermentação, como acontece nos experimentos de hidrólise a seguir, em que este termo se refere ao tempo de incubação com uma temperatura superior à temperatura de fermentação (32 °C).

As enzimas produzidas por FES passam pela etapa de extração, levando à obtenção do extrato enzimático e, em seguida, são liofilizadas e estocadas. Para os ensaios de hidrólise, esse extrato liofilizado foi dissolvido em água, em diferentes concentrações de forma a equivaler às diferentes atividades amilolíticas desejadas. O preparado comercial (Stargen™ 002) foi diluído em água, em diferentes concentrações, e o pH foi ajustado com ácido sulfúrico.

Em virtude da economicidade do processo e ainda colocando de forma mais próxima às condições de escala industrial, não houve a utilização de qualquer suplementação, moagem ou peneiração como forma de pré-tratamento físico da farinha de babaçu. Além disso, em nenhum experimento foi utilizado tampão, nem sequer houve a esterilização da matéria-prima (farinha de babaçu ou milho).

5.3.1 Ensaios preliminares

A fim de avaliar o potencial de hidrólise do amido granular das enzimas (extrato enzimático) produzidas por fermentação no estado sólido, foi realizado um conjunto de ensaios iniciais de hidrólise da farinha de babaçu.

Na Figura 5.5 pode ser visualizada a cinética de produção de glicose durante a hidrólise da farinha de babaçu, expressa em concentração de glicose. Neste primeiro experimento, foi comparado o poder hidrolítico do extrato enzimático próprio em comparação com o produto comercial Stargen™ 002 (fornecido pela Genencor). Foi realizado, ainda, um controle negativo, sem a presença de enzimas. Esse conjunto de experimentos de hidrólise foi realizado com 160 g/L (massa seca) de farinha, em frascos cônicos com agitação orbital de 200 rpm, em pH=5,0, adotando-se atividade amilolítica de 20 U/mL para o extrato enzimático e uma carga enzimática de 1,2 g/kg_{MP} para o preparado comercial (valor de carga recomendada pelo fabricante. A linha pontilhada indica a mudança da temperatura da reação, inicialmente de 50 °C,

posteriormente reduzida para 32 °C e mantida constante até o fim do experimento. Para garantir a temperatura da reação foi utilizado um sistema com aquecimento e controlador de temperatura.

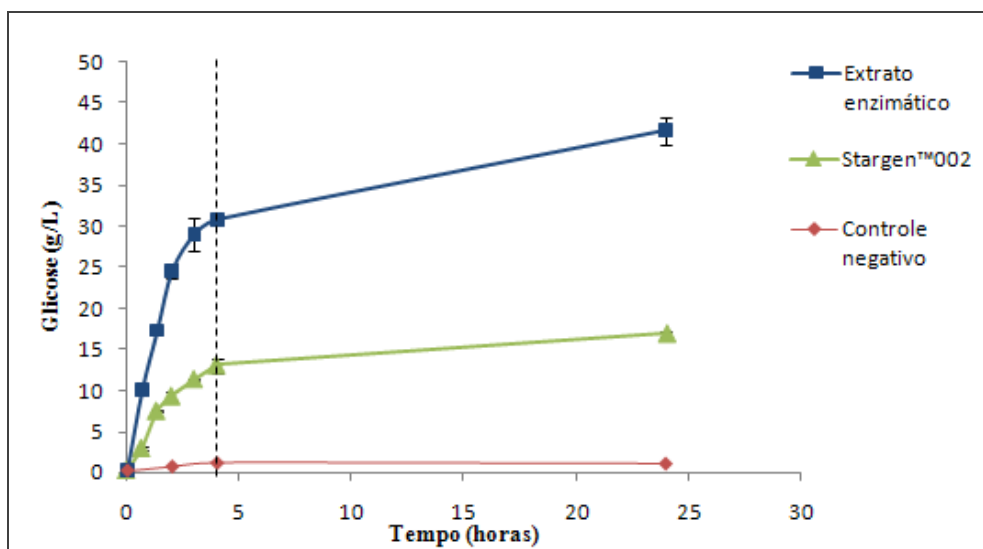


Figura 5.5: Perfis cinéticos de hidrólise da farinha de babaçu a 160 g/L, pH=5,0, com agitação orbital de 200 rpm. Extrato enzimático: 20 U/mL. Carga de Stargen: 1,2 g/Kg_{MP}. Controle negativo sem a presença de enzimas.

O resultado mostra um excelente potencial de hidrólise do extrato enzimático, comparativamente ao preparado comercial. Fica evidente, ainda, que sem a presença do catalisador a reação nessas condições não ocorre. Os dados com parâmetros de resposta comparativos podem ser vistos na Tabela 5.3. O extrato apresenta elevada taxa de hidrólise inicial, muito superior à do Stargen™ (12,67 g/(L.h) comparado a 4,91 g/(L.h)). A reação com uso do extrato enzimático produziu uma concentração de 41,63 g/L de glicose em 24 h de reação, enquanto a reação de hidrólise com o Stargen alcançou apenas 16,91 g/L em 24 h. Sem enzimas a concentração de glicose chegou ao máximo com 1,17 g/L. É importante ressaltar que a carga de enzima comercial utilizada foi a recomendada pelo fabricante, não sendo a mesma atividade presente na carga usada pelo extrato enzimático (outros resultados adotando a mesma base de comparação em termos de atividade enzimática serão discutidos mais adiante).

Tabela 5.3: Dados comparativos entre Stargen™, extrato enzimático e controle ao final de 24 horas de hidrólise.

Resposta	Stargen™002	Extrato Enzimático	Controle negativo
Taxa inicial de hidrólise (g/(L.h))	4,91	12,67	0,24
Concentração final de glicose (g/L)	16,91	41,63	1,08
Eficiência de hidrólise (%)	15,58	38,75	0,76
Produtividade de glicose (g/(L.h))	0,69	1,72	0,03

A eficiência de hidrólise máxima obtida com o extrato enzimático após 24 h foi de 38,75 %, o que representa 430,5 g de glicose/kg de amido. Portanto, em mais de 24 horas, ainda havia uma grande quantidade de substrato (amido) disponível. Um das possíveis razões para este desempenho seria devido à forma de condução do sistema reacional, principalmente a agitação. O sistema apresentou uma decantação ao longo do tempo de reação e, quanto maior os tempos, mais separadas ficaram: a fase líquida (água com as enzimas) e a fase sólida (grânulos de amido).

Para comprovar o efeito da agitação foi realizada a hidrólise com extrato enzimático sob as mesmas condições anteriores, em frascos *erlenmeyer* ou tubos tipo *falcon*, comparativamente aos experimentos conduzidos com uma mistura propiciada por agitadores magnéticos. A hidrólise realizada com uma mistura homogênea (agitador magnético) apresentou, já em 4 horas de reação, uma diferença estatisticamente significativa (com 95 % de confiança) e em 24 h a hidrólise do amido foi muito superior à realizada com agitação orbital, conforme serão observados nos próximos resultados. Portanto, doravante, todos os experimentos de hidrólise reportados foram conduzidos sob agitação magnética, buscando garantir a homogeneidade do sistema reacional.

É importante ressaltar que tal forma de condução, em reatores cilíndricos com agitação por barras magnéticas, se assemelha muito mais com reatores de larga escala do que experimentos conduzidos em *erlenmeyers* e com agitação orbital. Este fato pode vir a representar um ganho visando o escalonamento de processo, principalmente devido à similaridade geométrica e forma de agitação.

5.3.2 Investigação das variáveis de hidrólise com extrato enzimático

Um planejamento experimental fatorial 2^2 com pontos centrais (2 fatores, 2 níveis e 3 pontos centrais) foi empregado para estudar a influência da carga enzimática (em g/L ou em U/mL) e da concentração de farinha (em (m/m) em base úmida ou em g/L em base seca (g/L), na hidrólise do amido granular da farinha de babaçu). A Tabela 5.4 apresenta as variáveis que foram avaliadas neste estudo e os níveis, incluindo os pontos centrais. Este é o planejamento fatorial mais simples possível e permite apenas calcular os efeitos lineares e a interação entre os mesmos. O pH foi ajustado para 5,0 em todos os experimentos (ácido sulfúrico).

Os níveis de atividade enzimática (amilolítica) foram selecionados de forma que o nível -1 correspondesse à atividade obtida diretamente após a extração da FES e o nível +1 o extrato fosse concentrado em torno de 4 vezes, ou seja, com o liofilizado ressolubilizado em um volume de água 4 vezes inferior ao do extrato antes da liofilização.

Tabela 5.4: Influência da enzima e da concentração de farinha na hidrólise do amido granular.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Carga Extrato Enzimático (g/L)	11,60	30,97	50,34
ou em Atividade (U/mL)	4,0	12	20
Concentração de Farinha (%m*/m)	13,3	16,7	20
Ou em Base seca (g/L)	126	158	190

* em base úmida

Os resultados obtidos através dos sete ensaios realizados de acordo com este planejamento experimental, combinando-se os valores dos fatores enzima e farinha nos diferentes níveis, podem ser observados na Figura 5.6. A resposta medida foi a liberação de glicose e para cada condição foi gerada uma curva de hidrólise em função do tempo. A curva do ponto central representa a média das três respostas medidas (experimentos 5, 6 e 7). O objetivo foi apenas indicar qual região deveria ser utilizada para prosseguir a investigação das melhores condições de hidrólise, por esse motivo a simplicidade deste arranjo de experimentos. Vale ressaltar que se objetivou todo o tempo a maior quantidade de glicose produzida nos experimentos de hidrólise, já que

a meta consiste na produção de um meio com a maior concentração de glicose no menor tempo (maior produtividade).

A linha pontilhada indica a mudança da temperatura da reação, inicialmente de 50 °C e reduzida para 32°C após 6 horas. Todos os experimentos foram realizados simultaneamente em pequenos reatores (com temperatura controlada em banho com água) e com agitadores magnéticos.

Para este conjunto de experimentos, foram utilizadas ferramentas estatísticas para a análise dos resultados experimentais obtidos. Para tal, utilizou-se o *software* Statistica 7.0. Os efeitos lineares e a interação das variáveis dos planejamentos foram estimados e utilizados na construção de modelos matemáticos.

Com os resultados obtidos, foi possível obter um plano de resposta para cada tempo analisado (não é possível a previsão de termos quadráticos). O modelo utilizado pode ser descrito pela Equação 5.1.

(Eq. 5.1)

$$\text{Glicose (g/L)} = a_0 + a_1 * \text{Enz} + a_2 * \text{Far} + a_3 * \text{Enz} * \text{Far}$$

Onde: Glicose (g/L) representa a variável de resposta; a_0 , a_1 , a_2 e a_3 são os coeficientes do modelo; *Enz* representa a variável carga enzimática (g/L); e *Far* a concentração de farinha % (m/m).

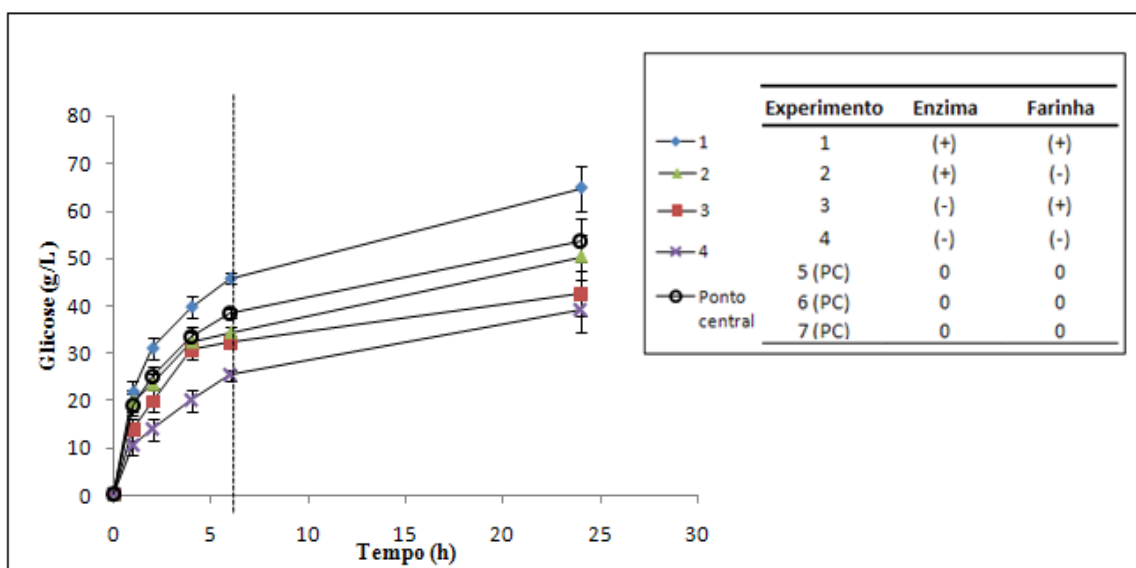


Figura 5.6: Resposta de hidrólise da avaliação do efeito de enzima e farinha. Experimentos 1, 2, 3 e 4 e ponto central se referem às condições do planejamento experimental. A linha pontilhada indica a mudança de temperatura.

Entretanto, o termo de interação linear entre as variáveis não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$), logo o último termo foi removido do modelo e apenas os termos lineares foram mantidos, de acordo com o diagrama de Pareto da Figura 5.7.

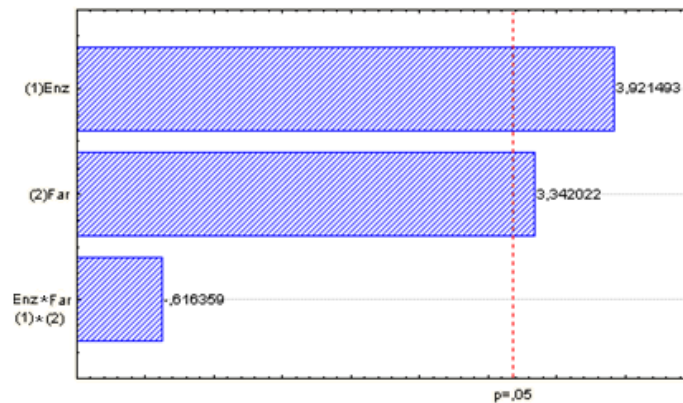


Figura 5.7: Diagrama de Pareto dos resultados do planejamento experimental de hidrólise para o tempo de 4 h.

Os resultados da análise de variância após a remoção do efeito apresentaram coeficientes de $R^2 = 0,8998$ e $R^2_{ajust} = 0,8306$. A Figura 5.8 apresenta o plano de resposta resultante considerando apenas as variáveis significativas (95 % de intervalo de confiança), para o tempo de 4 horas de hidrólise. As variáveis foram carga enzimática e concentração de farinha de babaçu, enquanto a resposta de hidrólise foi expressa em concentração de glicose produzida (g/L).

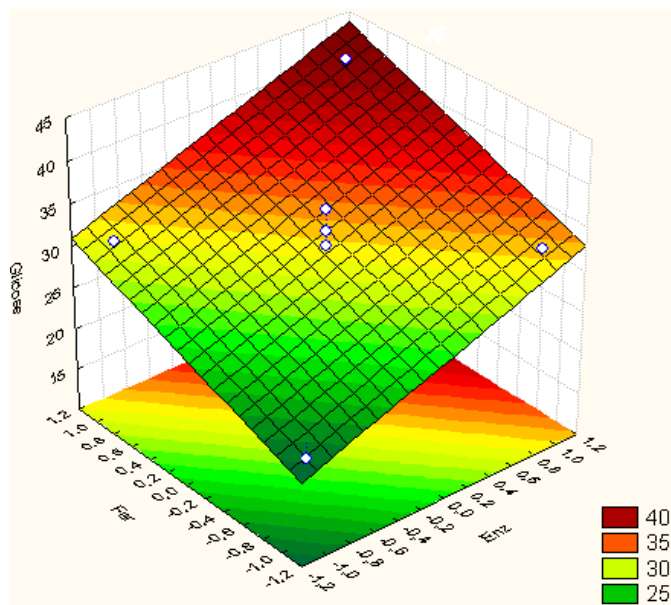


Figura 5.8: Plano de resposta do planejamento experimental de hidrólise para o tempo de 4 horas.

A análise descrita foi para o tempo de 4 horas de hidrólise, porém a mesma análise foi realizada para os tempos de 2 h, 6 h e 24 h e o comportamento foi o mesmo. Portanto, foi percebida uma mesma tendência, indicando que a maior produção de glicose segue em direção do experimento 1 (o ponto +1, +1), ou seja, as variáveis, carga enzimática e farinha, impactaram positivamente (e significativamente) a resposta. O aumento de substrato inicial de 126 g/L para 190 g/L melhorou a produção de glicose e o efeito da enzima também aumentou a resposta de forma linear na faixa de 4,5 U/mL a 20 U/mL. Vale ressaltar que foi percebido esse comportamento linear da resposta com relação às variáveis estudadas, mas somente para a região avaliada, e não se pode garantir o mesmo comportamento fora dessa região. Por este motivo sequer foi exposto o modelo de resposta gerado, pois este poderia ser aplicado apenas para a faixa estudada. A mesma análise, sobre este planejamento experimental, foi realizada sobre as taxas iniciais de hidrólise, utilizando o modelo presente na Equação 5.2. Novamente, o termo de interação linear entre as variáveis não se mostrou estatisticamente significativo, conforme apresentado no diagrama de Pareto da Figura 5.9.

$$\text{Taxa inicial de hidrólise (g/(L \cdot h))} = a_0 + a_1 * \text{Enz} + a_2 * \text{Far} + a_3 * \text{Enz} * \text{Far} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

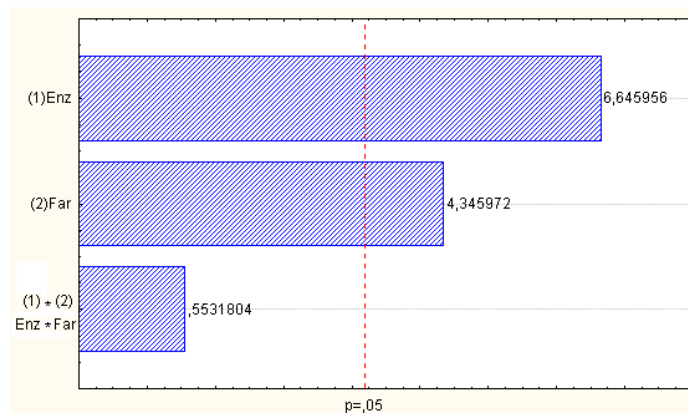


Figura 5.9: Diagrama de Pareto dos resultados do planejamento experimental para a taxa inicial de hidrólise.

Portanto, o último termo foi removido do modelo e os resultados da análise de variância, após a remoção do efeito, apresentaram coeficientes de $R^2 = 0,9502$ e $R^2_{ajust} = 0,9253$. A Figura 5.10 mostra o plano de resposta resultante, considerando apenas as variáveis significativas, para a taxa inicial de hidrólise. Também para esta variável resposta a faixa de maior carga enzimática e farinha mostrou o melhor potencial enzimático de hidrólise.

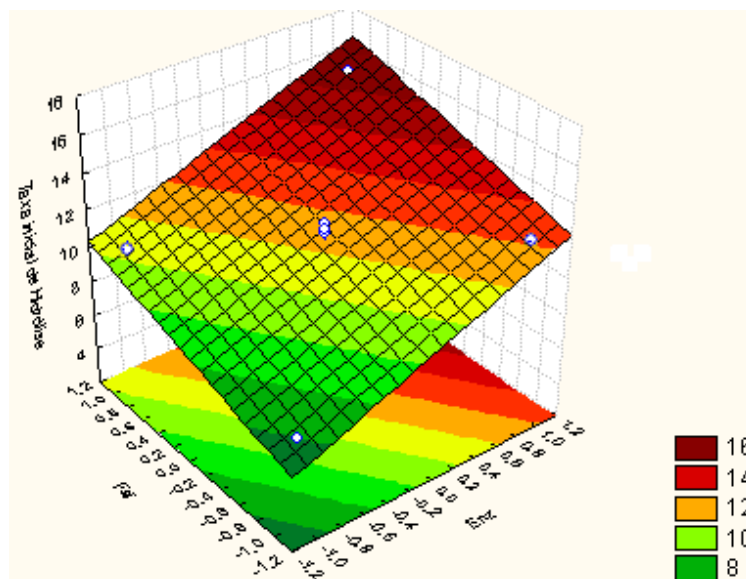


Figura 5.10: Plano de resposta do planejamento experimental para a taxa inicial de hidrólise.

Desta forma, buscou-se doravante investigar a região com atividades acima de 20 U/mL e concentração de farinha de babaçu superior a 190 g/L (ou 20 %). Com este intuito, foi planejado um arranjo de experimentos com concentração de farinha de 190 e 236 g/L, que representa o limite físico para a reação (acima desta concentração não

há mais suspensão) e variando a atividade amilolítica de 20, 32,5 e 45 U/mL (Figura 5.11). Os experimentos estão numerados de 1-6 e na legenda tem-se a descrição da condição de cada um. Novamente foi adotada a estratégia de 50 °C por 6 horas (linha pontilhada no gráfico) e depois 32 °C.

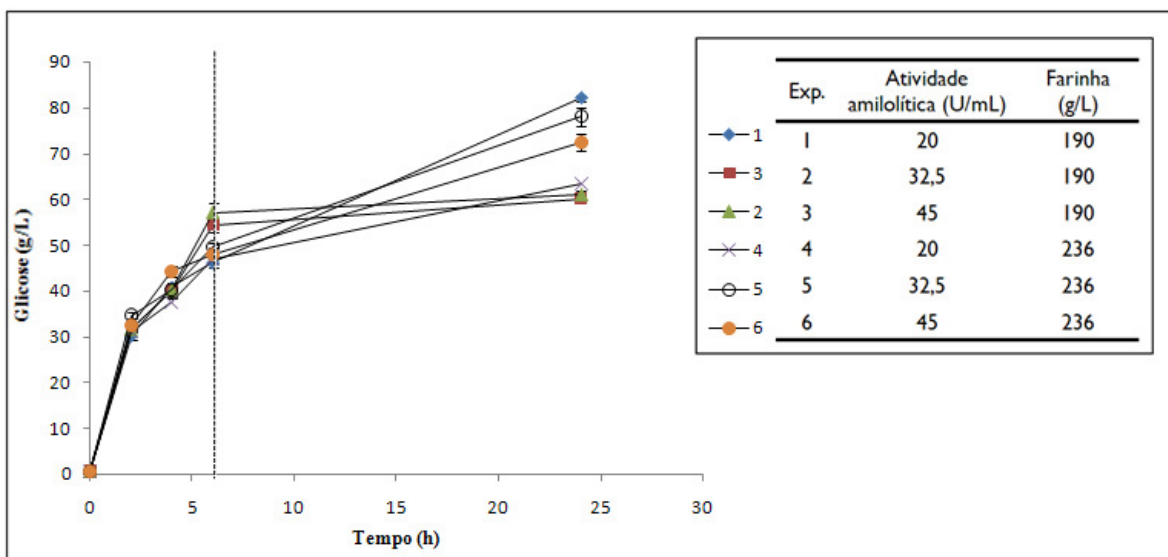


Figura 5.11: Investigação da região de maior produção de glicose na hidrólise em diferentes atividades enzimáticas e concentrações de farinha. A linha pontilhada indica a mudança de temperatura.

Pode-se observar que as curvas de resposta estão muito próximas uma das outras, até o tempo de 4 h de hidrólise o comportamento foi exatamente o mesmo em todos os experimentos. O resultado mostra ainda que o aumento da atividade e da concentração de farinha não representou um aumento na resposta medida (glicose produzida), mas sim o contrário: experimentos sob mesma condição, porém com maior concentração de farinha, tiveram menor produção de glicose em 24 h de hidrólise. Com 236 g/L, foi observado o limite físico de concentração de farinha, em que há um aumento na presença de sólidos dificultando a transferência de massa e assim menor produção de glicose foi obtida. O aumento da atividade amilolítica também não levou a uma maior produção de glicose ao final de 24 h, uma vez que acima de uma carga enzimática equivalente a 20 U/mL não houve acréscimo na produção de glicose.

5.3.3 Estudo do efeito da temperatura na hidrólise enzimática

Os experimentos de investigação do efeito da temperatura de hidrólise enzimática sobre a farinha de babaçu foram realizados em diferentes temperaturas constantes (30°C, 32°C, 40°C, 50°C e 60°C) por 24 h de reação, usando um controlador de temperatura e aquecedor sobre um banho de água (Figura 5.12). As variáveis atividade amilolítica (20 U/mL) e concentração de substrato (190 g/L de farinha de babaçu, em massa seca) foram adotadas para todos estes experimentos. Em todos os experimentos o pH foi mantido em 4,8 (fixa essa concentração de farinha e enzima, o pH se mantém neste valor sem necessidade de ajuste), com adição de azida de sódio (0,2 g/L) para evitar a contaminação. As barras de erro indicam uma unidade de desvio padrão. O experimento de controle negativo foi realizado sob as mesmas condições, porém com água ao invés de extrato enzimático e mantido sob a maior temperatura dos experimentos realizados (60 °C). A Tabela 5.5 resume os parâmetros de resposta destes ensaios de hidrólise.

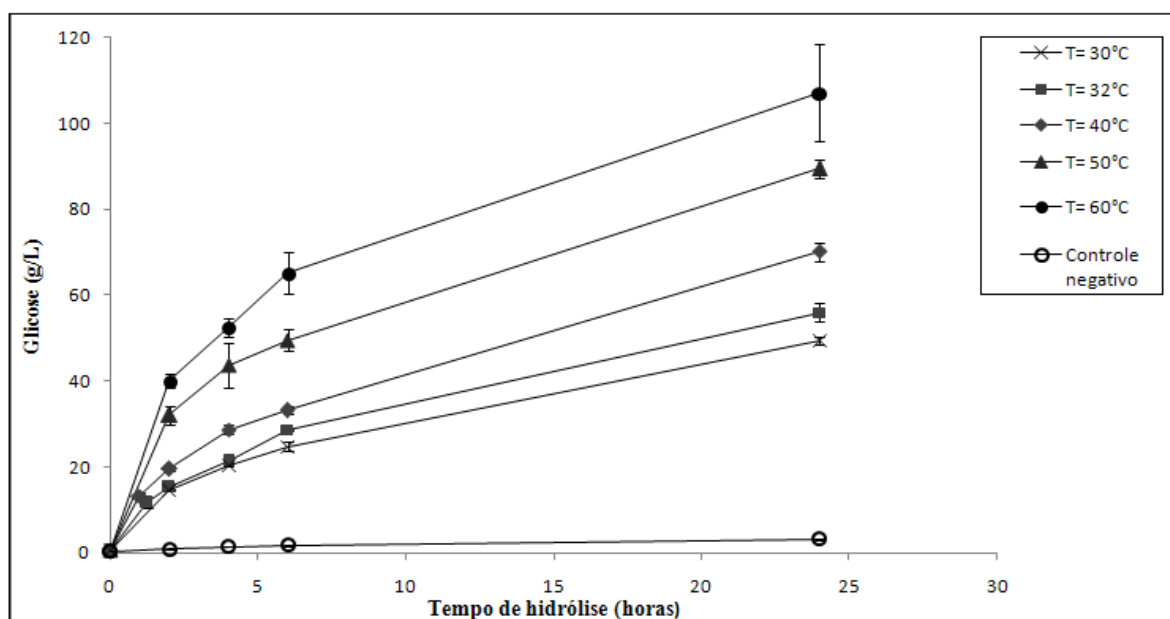


Figura 5.12: Perfis cinéticos de hidrólise em diferentes temperaturas. Experimentos 30°C, 32°C, 40°C, 50°C e 60°C realizados em suas respectivas temperaturas. O controle negativo foi realizado em enzima a 60°C.

Observou-se que a produção de glicose foi maior com o aumento da temperatura. A 50 °C (triângulos) e 60 °C (círculos preenchidos) a produção de glicose foi bem superior em relação aos demais experimentos, mesmo a partir de 2 h de

reação. É importante notar que, mesmo em temperaturas baixas, a 30 °C (xis) e 32 °C (quadrados) foi produzido 49,48 g/L e 56,01 g/L de glicose, respectivamente. A hidrólise a 32 °C resultou em uma taxa inicial de hidrólise de 9,48 g/(L.h), 43,72 % de eficiência de hidrólise e uma produtividade final de glicose de 2,31 g/(L.h).

Tabela 5.5: Parâmetros de resposta de hidrólise da farinha de babaçu com extrato a 30°C, 32°C, 40°C, 50°C e 60°C. Experimento controle sem extrato a 60°C.

Resposta	Experimento					Controle (60 °C)
	T= 30 °C	T= 32 °C	T= 40 °C	T= 50 °C	T= 60 °C	
Taxa inicial de hidrólise (g/(L.h))	6,91	7,34	9,48	15,71	19,67	0,29
Concentração final de glicose (g/L)	49,48	56,01	70,15	89,38	107,00	3,21
Eficiência de hidrólise (%)	38,53	43,72	54,88	70,04	83,94	2,07
Produtividade final de glicose (g/(L.h))	2,03	2,31	2,90	3,70	4,43	0,12

A 40 °C (losangos) foi obtida uma resposta intermediária entre as temperaturas mais baixas (30 e 32 °C) e mais altas (50 °C e 60 °C), com produtividade de 2,90 g/(L.h) de glicose. A hidrólise enzimática com temperatura de reação de 60 °C levou à maior concentração de glicose, entretanto para os tempos de 4 h e 24 h não houve superioridade estatística sobre os resultados encontrados com a 50 °C. Além disso, cabe ressaltar que à temperatura de 60 °C a matéria-prima está próxima do processo de gelatinização, fenômeno este que se inicia em torno de 4-10 °C antes da temperatura de gelatinização (SINGH *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2011). De fato foi observado ao longo da condução desse experimento (60 °C) um aumento da viscosidade. Por esses motivos ressaltados, não se seguiu mais investigando temperaturas acima de 50 °C. Os parâmetros de resposta para o experimento de T = 50°C foram: 15,71 g/(L.h) de taxa inicial de hidrólise; 70,04 % de eficiência; e 3,70 g/(L.h) de produtividade de glicose.

O experimento controle negativo (círculos vazados), sem a presença do biocatalisador, mostra que não houve reação mesmo com a elevada temperatura de 60 °C, apresentando taxas de hidrólise praticamente nulas.

5.3.4 Avaliação de estratégias de hidrólise

As mesmas condições de atividade enzimática, concentração de farinha e pH foram mantidas dos últimos experimentos (190 g/L de farinha de babaçu e 20 U/mL de atividade amilolítica, pH=4,8) e, desta forma, foram avaliadas diferentes estratégias, com etapa de pré-SSF a temperaturas de 40 °C e 50 °C por 4 e 6 horas, sendo mantida em seguida a temperatura de 32°C. Com intuito de se ter um parâmetro de comparação para avaliar a capacidade das enzimas produzidas, foram realizados alguns ensaios de hidrólise da farinha de babaçu, nas mesmas condições que as utilizadas para os experimentos com o extrato e o preparado comercial Stargen™ 002. A Figura 5.13 mostra as curvas de produção de glicose durante a hidrólise do amido granular, das diferentes estratégias e comparação com enzima comercial.

Nesta comparação do extrato próprio e comercial foi usada a mesma atividade amilolítica (20 U/mL). Esse valor de atividade utilizado representa para o produto Stargen uma carga de 5,4 g/kg_{Matéria-Prima}, um valor bastante superior ao da carga sugerida pelo fabricante da enzima comercial (1,2 g/kg_{MP}) .

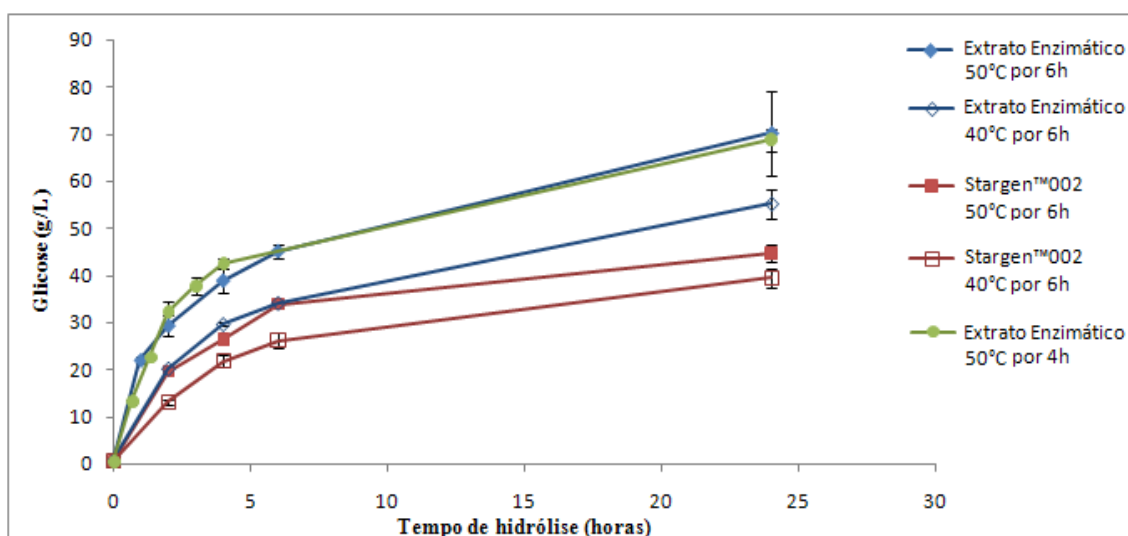


Figura 5.13: Perfis cinéticos de hidrólise do Estudo com diferentes estratégias e comparação com enzimas comerciais. Experimentos com extrato e Stargen com temperaturas de 40 °C e 50 °C por 6 horas, em seguida de 32°C, e extrato enzimático a 50 °C por 4 horas com restante a 32°C.

Pela análise da Figura 5.13 pode-se perceber que a hidrólise com o extrato enzimático foi superior àquela proporcionada pelo comercial Stargen™ 002, obtendo-

se 70,2 g/L contra 44,7 g/L de glicose em 24 h, respectivamente. Os símbolos preenchidos representam a etapa de pré-SSF a 50 °C e os símbolos vazados a 40 °C, os quais tiveram resultados inferiores. Comparando a estratégia de 6 horas de pré-SSF (losangos preenchidos) contra 4 horas (círculos), observou-se que os resultados foram equivalentes, ou seja, não houve qualquer ganho significativo em realizar esta etapa por 6 horas em relação com 4 horas. Se em menos tempo a uma temperatura de 50 °C o resultado foi o mesmo, provavelmente representando vantagens econômicas, decidiu-se adotar a pré-SSF a 50°C com duração de 4 h como a principal estratégia.

Para melhor visualização dos resultados obtidos nas diferentes condições de experimentos de hidrólise, a Tabela 5.6 mostra um resumo dos dados obtidos com etapa de pré-SSF com Stargen e extrato a 50 °C e restante a 32 °C, assim como com extrato sem a etapa de pré-SSF, ou seja, constante a 32 °C durante todo o experimento.

Tabela 5.6: Taxa inicial de hidrólise, eficiência de hidrólise da farinha de babaçu, rendimento e produtividade de glicose obtidos após 4 h e 24 h de hidrólise para diferentes estratégias com produto comercial Stargen™ 002 e com extrato enzimático.

		Experimento			
Resposta		Stargen™002 6h a 50 °C	Extrato 6h a 50 °C	Extrato 4h a 50°C	Extrato T= 32 °C
Tempo de 4h	Taxa inicial de hidrólise (g/(L.h))	9,60	14,64	16,55	7,34
	Eficiência de hidrólise (%)	20,48	30,45	33,25	16,45
	Rendimento (g _{glicose} /kg _{amido})	227,53	338,29	369,47	182,73
	Produtividade de glicose (g/(L.h))	6,49	9,59	10,54	5,21
Tempo de 24h		Stargen™002 6h a 50 °C	Extrato 6h a 50 °C	Extrato 4h a 50°C	Extrato T= 32 °C
	Eficiência de hidrólise (%)	34,91	54,95	54,00	43,72
	Rendimento (g _{glicose} /kg _{amido})	387,84	610,51	599,97	485,77
	Produtividade de glicose (g/(L.h))	1,84	2,90	2,85	2,31

Os dados apresentados na Tabela 5.6 mostram que, analisando todos os parâmetros de resposta, o desempenho do extrato enzimático foi superior ao obtido com Stargen™ 002. Em 24 h o extrato apresentou uma eficiência de hidrólise de 54,95 % e produto comercial de 34,91 %, sob as mesmas condições de reação. É importante ressaltar que o próprio fabricante do produto Stargen recomenda uma etapa de pré-tratamento com uma temperatura mais elevada e na mesma faixa de pH que foi utilizada neste experimento, portanto, este produto foi aplicado sob as condições sugeridas pelo fabricante, exceto pela carga enzimática, que foi até mesmo superior à recomendada. Além da resposta final, uma válida forma de comparação, é a taxa inicial de hidrólise. Sob as mesmas condições, o extrato apresentou uma taxa inicial de hidrólise de 14,64 g/(L.h), enquanto o produto Stargen™ 002 apresentou 9,60 g/(L.h).

Os dados confirmam que a etapa de pré-SSF se faz necessária e que o desempenho do processo para 4 ou 6h de pré-SSF é equivalente. Em 4 horas de reação, a taxa de produção de glicose foi mais do que duas vezes maior do que sem a etapa de pré-SSF (todo a 32 °C). A taxa inicial de hidrólise com T=32°C (sem pré-SSF) foi de apenas 7,34 g/(L.h), enquanto com 4 h de pré-SSF foi de 16,55 g/(L.h).

Os resultados obtidos revelam que o extrato multienzimático produzido por FES possui um excelente potencial para hidrolisar o amido (granular) não gelatinizado. BLAZEK e GILBERT (2010) investigaram a hidrólise do amido granular a partir de milho, arroz, trigo, mandioca e batata, após 24 horas de reação com α -amilase e glucoamilase a 37 °C. Segundo os autores foi obtida uma conversão do amido de 50 % para o milho, 48 % para o trigo, 51 % para o arroz, 43 % para a farinha de mandioca e 18 % de digestão do amido de batata. CASTRO *et al.* (2010b) realizaram um planejamento experimental para avaliar a capacidade hidrolítica em diferentes temperaturas de 36 a 60 °C e diferentes valores de pH entre 3,6 e 6,0, de diferentes extratos enzimáticos sobre a torta de babaçu. Segundo os autores na melhor condição foi obtida uma conversão do amido em glicose de 12 %, e pouco mais de 52 % de conversão em ART, ao final de 24 h.

NAGASAKA *et al.* (1998) estudaram a hidrólise de amido granular de diversas fontes a 40 °C, a partir de glucoamilase purificada de *Corticium rolfsii* e obtiveram bom desempenho (entre 65 % e 90 % de hidrólise) para milho e arroz em 24 h. No entanto,

sua ação sobre farinha de mandioca, sagu, batata-doce e batata foi bem inferior, resultando em menos de 50 % de hidrólise, mesmo após 96 h de processo.

Para o cálculo desses parâmetros (descritos na seção 4.7) é considerada a glicose produzida ao longo da reação, portanto as concentrações iniciais de glicose foram descontadas. Os valores de concentração de glicose inicialmente presentes na reação de hidrólise (tempo zero) no extrato ou no produto comercial Stargen™ 002 oscilaram dentro da faixa de 0,27 e 0,64 g/L. Contudo, para as curvas apresentadas na Figura 5.13 os valores de concentração de glicose são os brutos, sem descontar as concentrações iniciais de glicose. O primeiro ponto de cada curva não foi medido, mas sim calculado a partir dos teores de glicose presentes na farinha de babaçu (seção 5.1) em cada concentração e nos preparados enzimáticos (extrato próprio ou no Stargen), devido aos elevados erros inerentes associados a uma amostragem durante a rápida hidrólise inicial.

5.3.5 Desempenho de hidrólise do amido granular em 72 h

Com base nos dados obtidos nos experimentos preliminares, nos resultados do planejamento experimental, nos estudos de análise do efeito da temperatura, juntamente com os resultados dos experimentos de avaliação das estratégias, foram realizados ensaios de hidrólise da farinha de babaçu para acompanhamento do perfil cinético de produção de glicose por um tempo de 72 horas. Foi adotada a estratégia de 50 °C por 4 h iniciais e o restante a 32 °C, com uma concentração inicial de farinha de 190 g/L, atividade amilolítica inicial de 20 U/mL e pH=4,8 (sem necessidade de ajuste para o extrato enzimático). A farinha de babaçu foi utilizada em todos os experimentos sem qualquer tipo de tratamento prévio (inclusive sem esterilização). Em experimentos preliminares cujos dados são mostrados no Apêndice A, foi realizado um estudo com diferentes granulometrias da farinha, o qual mostrou que as faixas granulométricas testadas (farinha < 400 mesh Tyler, entre 150-400 mesh, 35-150 mesh) forneceram resultados equivalentes à hidrólise da farinha não peneirada (ver apêndice A).

A Figura 5.14 apresenta os perfis cinéticos de hidrólise nessas condições com o extrato enzimático e com Stargen™ 002, em termos de produção tanto de glicose

quanto de FAN (nitrogênio livre) por 72 horas. Foi realizado ainda um experimento sem enzimas, o controle negativo. O experimento de hidrólise com o extrato enzimático foi realizado em triplicata com enzimas produzidas por três diferentes fermentações. Os outros dois experimentos foram realizados em duplicata.

Analisando-se os perfis cinéticos apresentados na Figura 5.14, observa-se que mais uma vez a produção de glicose com o extrato enzimático foi superior àquela obtida com o Stargen™ 002, sendo que ao final de 72 h o extrato obteve 110,9 g/L de glicose contra 74,5 g/L de glicose com o preparado comercial. Portanto, com esta estratégia utilizada, obteve-se com o extrato enzimático em 72 h de reação uma eficiência de hidrólise de 86,97 % e um rendimento de 966,4 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{kg}_{\text{amido}}$ (lembrando que no máximo pode-se obter 1111 $\text{g}_{\text{glicose}}/\text{kg}_{\text{amido}}$). Além disso, BARUQUE FILHO *et al.* (2000) determinaram que, para o processo convencional sob elevadas temperaturas, independentemente da carga de enzimas amilolíticas, após a hidrólise do amido da farinha de babaçu, uma fração residual de 3-7 % do polissacarídeo permanece no sistema, o que foi atribuído a uma parte do amido da farinha resistente à hidrólise. Portanto, as enzimas presentes no complexo enzimático foram capazes de converter praticamente todo amido disponível em glicose. A Tabela 5.7 mostra uma comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com a literatura.

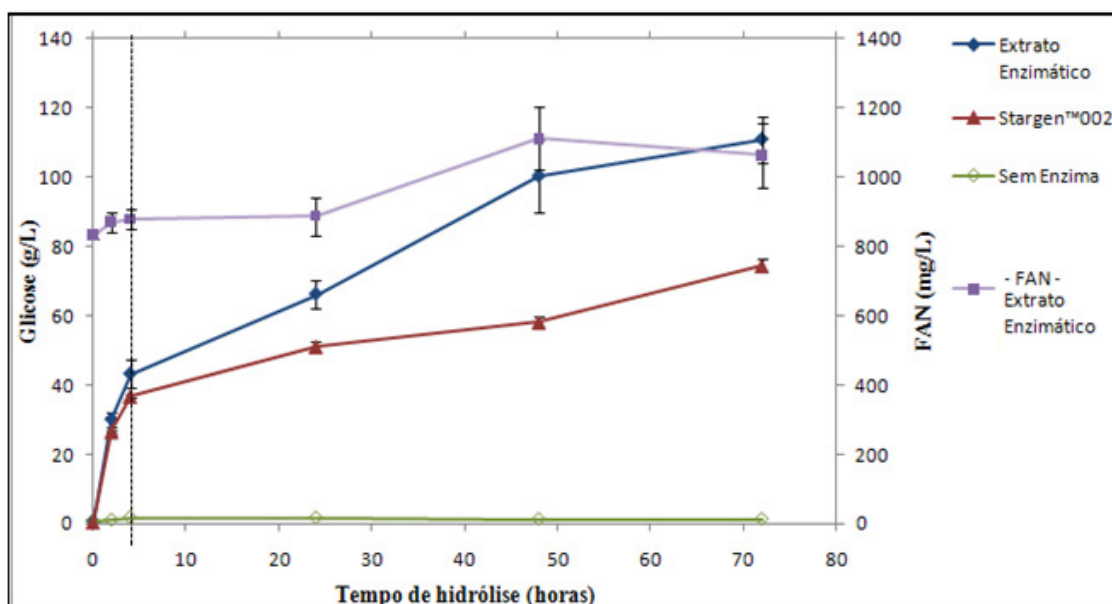


Figura 5.14: Perfis cinéticos de hidrólise por 72 h com a produção de glicose (em g/L) e concentração de FAN (em mg/L). A linha pontilhada indica mudança na temperatura de 50 °C

para 32 °C. A concentração de FAN foi determinada apenas para os experimentos conduzidos com o extrato enzimático.

O resultado apresentado evidencia o excelente potencial de hidrólise do amido granular com o uso deste extrato produzido por FES. RATTANACHOMSRI *et al.* (2009) reportaram uma eficiência de hidrólise de 91,7 % do amido da polpa de mandioca em 48 h a 40 °C, com um extrato produzido por *A. niger*. BALAN *et al.* (2009) também investigaram a hidrólise do amido granular de matérias-primas agroindustriais não convencionais, utilizando diversas enzimas comerciais. Segundo os autores, com 72 h de reação a 50 °C, as hidrólises de tortas de canola, girassol e gergelim apresentaram rendimentos de 105 g_{glicose}/kg_{MP}, 90 g_{glicose}/kg_{MP} e 70 g_{glicose}/kg_{MP}, respectivamente. Esses valores são inferiores aos obtidos no presente estudo, no qual foi observado 580 g_{glicose}/kg_{MP} (equivalente a 966,4 g_{glicose}/kg_{amido}) em 72 h de hidrólise. PICKENS *et al.* (1986) obtiveram resultados de eficiência de hidrólise do amido de 88 % ao longo de 96 h a uma temperatura de 55 °C. Portanto, nota-se que o resultado obtido com o extrato enzimático próprio sobre a farinha de babaçu foi equivalente ou superior aos demais trabalhos reportados na literatura sobre hidrólise do amido granular. O resultado ficou próximo ainda ao processo convencional de hidrólise com gelatinização da farinha de babaçu.

Tabela 5.7: Comparação do presente trabalho com processos da literatura. Todos os trabalhos reportam processos de hidrólise do amido granular, com exceção do trabalho de BARUQUE-FILHO et al. (2000), que diz respeito ao processo convencional, porém especificamente a mesma matéria-prima do presente trabalho.

Matérias-primas	Condições de hidrólise	Enzimas	Respostas	Referências
Polpa de Mandioca	T=40°C, pH=5,0 Por 48 h	Extrato de <i>A. niger</i>	91,2% de eficiência de hidrólise	RATTANACHOMSRI et al. (2009)
Amido	T=55°C, pH=5,5 por 96 h	<i>Humicola griseus</i> var. <i>thermoidea</i>	88% de eficiência de hidrólise	PICKENS et al. (1986)
Milho e Mandioca	T=35°C, pH=4,4 por 24 h	STARGEN 001	52,6 % e 35,4% de degradação da MP	UTHUMPORN et al. (2009)
Triticale e Milho	T=30°C, por 96 h	STARGEN 002	64 % e 60 % de eficiência de hidrólise	LI et al. (2012)
Trigo, Milho e Arroz	T=37°, pH=6,0 por 24 h	<i>α-amilase</i> pancreática e glucoamilase de <i>A.niger</i>	48%, 50% e 51% de eficiência de hidrólise	BLAZEK e GILBERT (2010)
Torta de Babaçu	T=45-51°C, pH=3,6-3,9 por 24 h	Extrato de <i>A. awamori</i>	52% de eficiência de hidrólise	CASTRO et al. (2010)
Farinha de babaçu	Liquefação e Sacarificação. T=90°C e 60°C pH=6,0 e pH=4,5	Termamyl 1201 (<i>α-amilase</i>) e AMG 200 1 (glucoamilase)	90-97 % de eficiência de hidrólise	BARUQUE FILHO et al. (2000)
Farinha de babaçu	T=32°, pH=4,8 por 72 h ^b	STARGEN 002	58,4 % de eficiência de hidrólise	PRESENTE TRABALHO
Farinha de babaçu	T=32°, pH=4,8 por 72 h ^b	Extrato enzimático próprio de <i>A. awamori</i>	87,0 % de eficiência de hidrólise	PRESENTE TRABALHO

^a Processo de hidrólise convencional

^b Inclui o tempo de 4 horas a 50°C

Sem a presença do biocatalisador (controle negativo) mais uma vez a reação de hidrólise do amido não aconteceu mesmo por um tempo mais longo de 72 h. A curva de FAN (*Free Amino Nitrogen*) para o caso do extrato enzimático indica a quantidade de nitrogênio livre expressa como α -amino nitrogênio de aminoácidos presente no meio reacional. Portanto, pode-se perceber que o valor inicial de FAN parte de mais de 830 mg/L e atinge níveis máximos de 1113 mg/L em 48 h. O valor inicial elevado se deve ao nitrogênio proveniente da fermentação em estado sólido com o fungo *A. awamori* sobre a torta de babaçu. Esta torta possui em torno de 23 % de proteína (GOMBERT et al., 1999), portanto o extrato obtido ao final da fermentação e extração já possui um alto teor de FAN produzido ao longo da fermentação do fungo (que

provavelmente hidrolisa as proteínas da torta liberando aminoácidos). Vale notar que os valores de FAN produzidos com o Stargen™ 002, embora tenham sido realizadas, sequer foram mostrados no gráfico, pois permaneceram sempre próximos a zero (o valor máximo quantificado foi de 36,9 mg/L de FAN).

Com relação à variação da concentração de FAN no experimento com o extrato enzimático (830-1113 mg/L), ou seja, à quantidade de FAN efetivamente produzida na hidrólise, esta se deve à capacidade das enzimas presentes no extrato de hidrolisar proteínas da matéria-prima. Vale lembrar que a farinha de babaçu possui uma pequena quantidade de proteínas em sua composição (2,98 % em massa seca), portanto, a quantidade de FAN produzida foi significativa. Considerando-se que todo FAN medido corresponde ao nitrogênio de aminoácidos (supondo-se que 20 % em massa do aminoácido equivale ao α -amino nitrogênio, como acontece com a glicina), obtém-se um rendimento de 247,9 ($\text{g}_{\text{aminoácido}}/\text{Kg}_{\text{proteína}}$), o que representaria uma conversão de aproximadamente 25 % do nitrogênio presente na farinha em FAN. WANG *et al.* (2010b) chegaram a produzir na hidrólise enzimática de canola uma concentração de 449 mg/L de FAN e em 47 h uma conversão de 54 % do nitrogênio total em FAN. KOUTINAS *et al.* (2004) também estudaram a hidrólise enzimática de proteínas para produção de FAN e obtiveram um máximo de 30 % de conversão sobre a farinha de trigo gelatinizada e 26 % sobre farinha não gelatinizada.

Desta forma, o resultado final de hidrólise com o extrato enzimático na estratégia de 50 °C por 4h iniciais e as demais 68 h a 32 °C, com concentração inicial de farinha de 190 g/L, atividade amilolítica inicial de 20 U/mL e pH=4,8, produziu um meio completo com mais de 110 g/L de glicose (fonte de carbono e energia para levedura) e 1113 mg/L de FAN (fonte de nitrogênio). Uma comparação da produção deste meio de cultivo, produzido após a hidrólise do amido granular de babaçu, é mostrada na Figura 5.15 para a melhor condição com o extrato enzimático e com Stargen™002. Vale notar que o valor de FAN encontra-se expresso em centigrama (cg), apenas para ajuste na escala do gráfico. Cabe ressaltar, ainda, que o pH de 4,8 é obtido sem qualquer necessidade de ajuste quando do uso do extrato enzimático, e que este pH é excelente para a ação de leveduras.

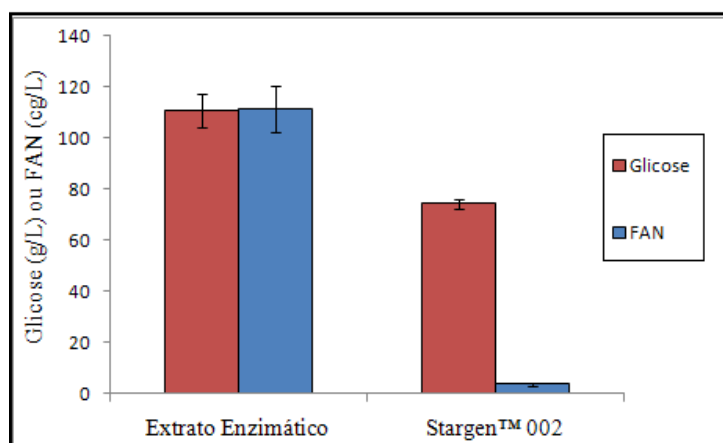


Figura 5.15: Concentração de glicose em g/L e FAN em cg/L produzidos nas melhores condições do extrato enzimático e Stargen™002.

É importante ressaltar que o preparado comercial (Stargen™) apresenta essencialmente atividade amilolítica, ou seja, não apresenta atividade das enzimas acessórias, sendo provavelmente este um dos principais motivos para o inferior desempenho apresentado. Estudos presentes na literatura mostram a necessidade do uso adicional de enzimas acessórias além do preparado comercial. WANG *et al.* (2009a) mostraram que o uso de proteases aumentou a produção de etanol de milho além de reduzir a carga de Stargen™ requerida. KOPNIECZNY-JANDA *et al.* (2008) também utilizaram a adição de dois diferentes preparados além de Stargen™, sendo um à base de proteases (Fermgen™) e outro de β -glucanases (Optimash™ BG).

Portanto, fica evidente que o complexo multienzimático presente no extrato enzimático próprio, produzido por FES, contendo enzimas amilolíticas e acessórias, é essencial para permitir a hidrólise de quase todo amido granular em glicose, além de converter parcialmente as proteínas em aminoácidos.

Análises sobre as respostas de hidrólise revelaram que os teores medidos de açúcares redutores totais (ART) e glicose eram praticamente idênticos ao longo da reação, demonstrando uma alta correlação entre ART (quantificado por DNS) e glicose (método enzimático) (ver apêndice B), indicando que a glicose foi o produto dominante nas reações de hidrólise do amido. A Figura 5.16 mostra o perfil cromatográfico de açúcares presentes na amostra de hidrólise após 72 h de reação com o extrato enzimático, deixando evidente que a conversão do amido resultou em um único açúcar como produto – a glicose. Vale ressaltar que com esta coluna

cromatográfica é possível quantificar diversos açúcares, inclusive oligômeros derivados do amido.

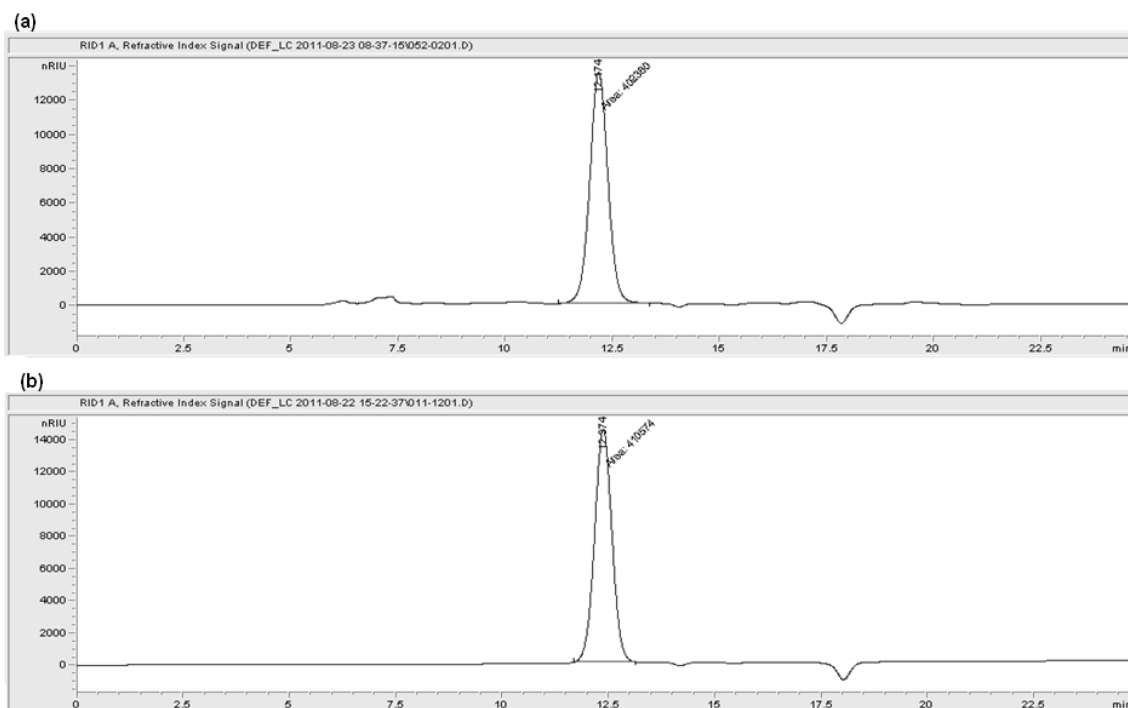


Figura 5.16: Perfil cromatográfico de açúcares: (a) hidrólise da farinha de babaçu após 72 h com extrato enzimático; (b) padrão de glicose.

Este fato demonstra mais uma importante característica do potencial de ação deste complexo enzimático sobre o amido granular, resultando em apenas um único açúcar, que é o principal substrato de metabolização para as leveduras e outros microrganismos. Esta é uma característica singular apresentada por estas enzimas presentes no extrato. KOPNIECZNY-JANDA *et al.* (2008) apresentaram um perfil de açúcares presentes após a hidrólise do amido granular e identificaram significativas quantidades de maltose, maltotriose e açúcares com mais de três unidades de glicose.

A fim de permitir uma visualização e maior compreensão da ação das enzimas do complexo enzimático, os grânulos de amido foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) ao longo da hidrólise enzimática. As micrografias apresentadas na Figura 5.17 revelam que os grânulos de amido da farinha de babaçu foram progressivamente degradados até 72 h de hidrólise. No controle, com os grânulos nativos (sem incubação) de amido da farinha de babaçu (sem adição de enzimas), pode-se perceber que os grânulos de amido se mantêm íntegros e

apresentam uma forma oval e com diâmetros menores que 20 μm . As imagens de microscopia revelaram grânulos de amido com diferentes graus de degradação resultantes do tratamento enzimático em 24 h e 48 h; nestes tempos, os grânulos se apresentaram muito heterogêneos, uns totalmente degradados enquanto outros apenas parcialmente degradados. Após 72 h já não havia mais grânulos inteiros.

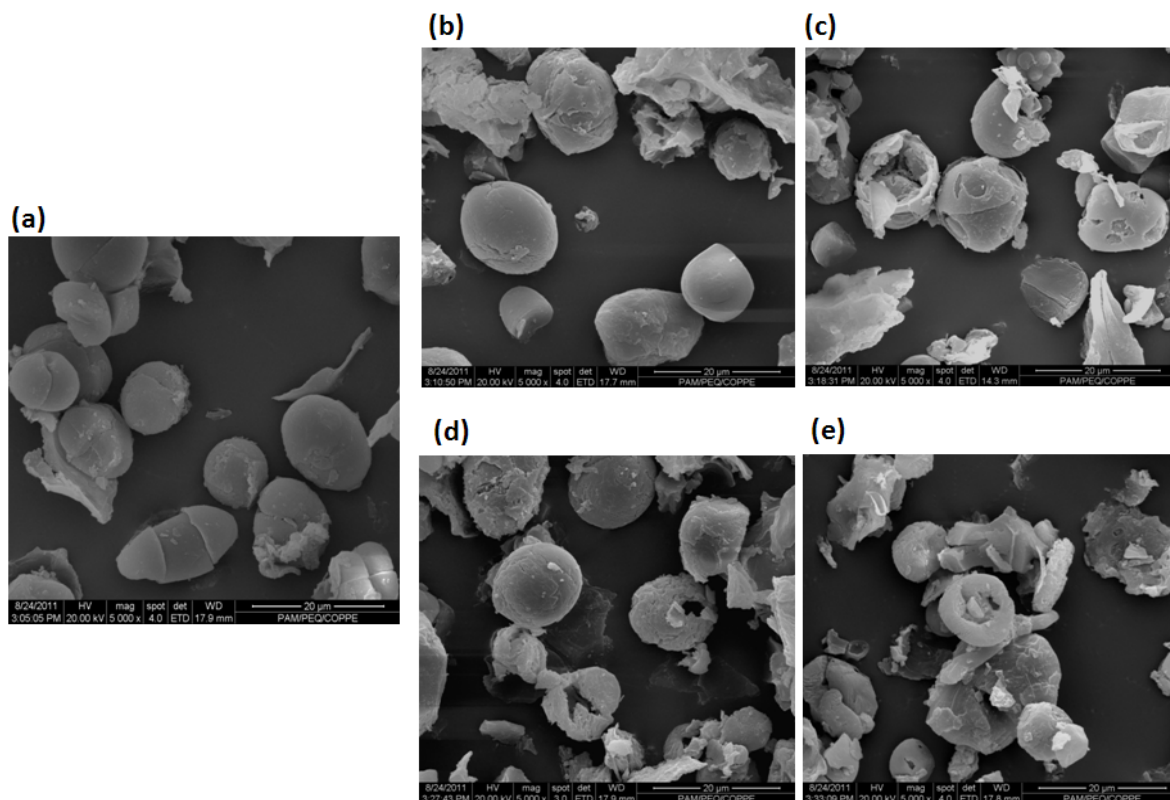


Figura 5.17: Micrografias obtidas por MEV (5000x) dos grânulos de amido da farinha de babaçu. Sendo (a) grânulos de amido nativos, sem enzima (controle); (b) após 4 h de hidrólise com extrato enzimático; (c) 24 h; (d) 48 h; e (e) 72 h.

Para uma melhor visualização as micrografias da Figura 5.18, com uma magnificação de até 17119x, mostram em mais detalhes a superfície degradada dos grânulos de amido. O grânulo nativo de amido apresenta uma superfície totalmente lisa e com poucas imperfeições, sendo que as rachaduras podem ter sido provocadas pelo método de preparo que envolve liofilização conforme descrito por APINAN *et al.* (2007). Em 4 h de hidrólise, as enzimas parecem ter atuado sobre os grânulos de amido de babaçu apresentando uma degradação do tipo centrípeta e também a degradação periférica do tipo centrífuga. A degradação centrípeta ocorre a partir da superfície para o centro, em que as enzimas agem progredindo ao longo das cadeias

de polissacarídeos, formando cavidades na superfície. Por outro lado, a hidrólise centrífuga é provocada pela erosão de enzimas aprisionadas dentro dos grânulos, por um movimento mais difusivo das enzimas, sendo que em uma visão mais externa do grânulo esta ação se mostra mais pontual com a presença de pequenos poros formados na superfície (HELBERT *et al.*, 1996). Com 24 h de hidrólise o grânulo apresenta várias cavidades, canais e também alguns poros, enquanto que em 72 h de reação, os grânulos estão totalmente degradados.

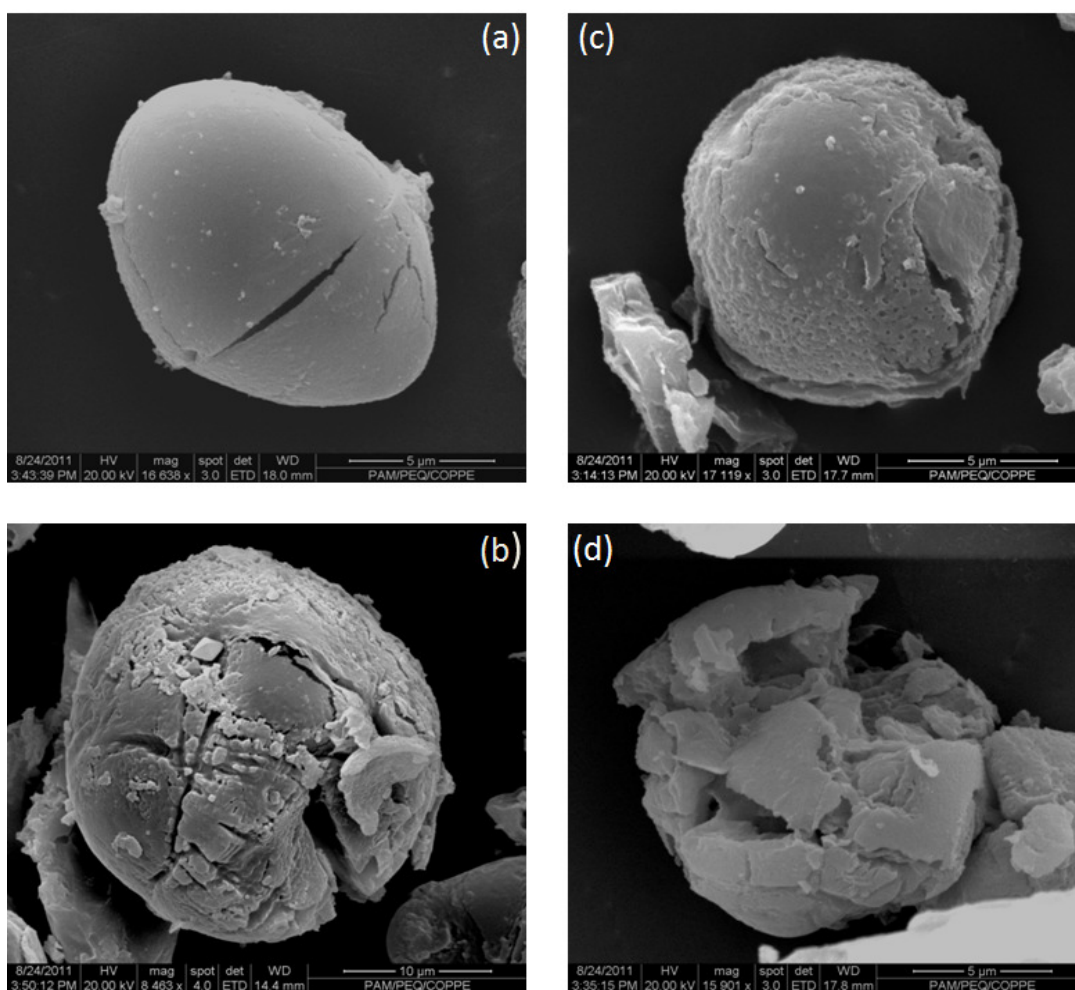


Figura 5.18: Micrografias obtidas por MEV dos grânulos de amido da farinha de babaçu. Sendo (a) grânulo de amido nativo, sem enzima (controle); (b) após 4 h de hidrólise com extrato enzimático; (c) 24h; (d) 72 h.

5.3.6 Hidrólise do amido granular de milho

Outro ponto importante, com relação à comparação do extrato próprio com o Stargen™, se deve ao fato de que os produtos da linha Stargen™ foram preparados

para atuar principalmente no milho (principal matéria-prima nos Estados Unidos), embora o fabricante indique para o uso de qualquer matéria-prima amilácea.

Portanto, a fim de propiciar uma comparação mais justa entre o preparado comercial Stargen™ e o extrato enzimático próprio, foi realizada a hidrólise da farinha de milho. A Figura 5.19 mostra os perfis cinéticos de produção de glicose por um tempo total de 72 h, com o extrato enzimático em comparação com o Stargen™002 sob as mesmas condições. Para esses experimentos foi adotada a mesma estratégia anteriormente exposta, a 50 °C por 4h iniciais e o restante do tempo a 32 °C, com atividade amilolítica inicial de 20 U/mL, em pH=4,8; porém com uma concentração inicial de farinha de milho de 209 g/L (base seca).

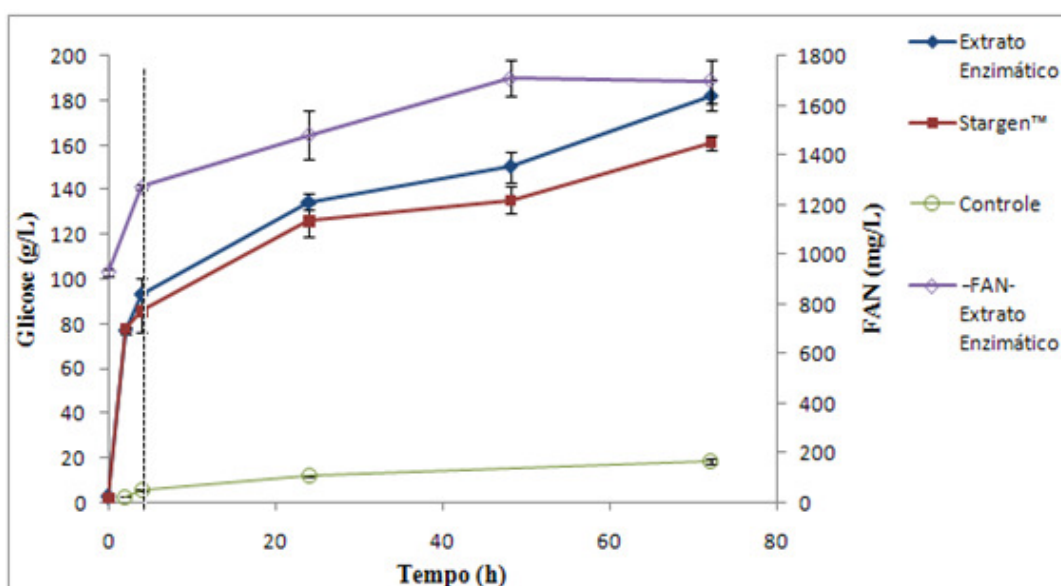


Figura 5.19: Perfis cinéticos de hidrólise de farinha de milho com o extrato enzimático, Stargen™002 e sem enzima (controle) por 72 h. A linha pontilhada indica mudança na temperatura de 50 °C para 32 °C.

Neste experimento de comparação pode-se perceber que o extrato enzimático apresentou uma cinética de produção de glicose apenas levemente superior ao Stargen™ 002. O comportamento foi bastante similar, praticamente não havendo diferença na resposta de hidrólise (quase 70 % de conversão) até 24 h de reação. Ao final de 72 h de reação com extrato, atingiu-se 182,6 g/L de glicose e uma eficiência de hidrólise de 94,5 %, enquanto com Stargen™002 foi obtido 161,4 g/L de glicose e 83,5 % de conversão. Este resultado mais uma vez mostra a excelente capacidade desse

complexo enzimático em hidrolisar o amido granular, mesmo em outra matéria-prima diferente do babaçu. UTHUMPORN *et al.* (2009) investigaram a hidrólise do amido de milho em temperaturas abaixo da gelatinização e verificaram que, em 24 h de hidrólise a 35°C, 52,6 % do milho foi convertido em glicose. LI *et al.* 2012 também estudaram a hidrólise do milho com Stargen™002 e, após 96 h a 30 °C, obtiveram 60 % de eficiência de hidrólise do amido granular. Segundo os autores com a utilização de uma etapa de pré-aquecimento (similar ao pré-SSF) foi possível chegar a 70 % de eficiência de hidrólise em 48 h.

A Figura 5.19 apresenta ainda o perfil de FAN produzido pela hidrólise do extrato enzimático, atingindo uma concentração máxima de 1712 mg/L em 48 h de reação. Devido à mesma razão exposta anteriormente, o valor inicial de FAN (927 mg/L) é elevado, devido aos aminoácidos presentes no extrato enzimático. Contudo, a variação entre as concentrações final e inicial, ou seja, o FAN produzido ao longo da hidrólise da proteína do milho, foi de 785 mg/L, portanto superior ao obtido ao longo da hidrólise do babaçu. Isto se deve ao maior teor de proteína na farinha de milho do que na farinha de babaçu. Por outro lado, a conversão de proteínas em aminoácidos foi praticamente a mesma, levemente superior a 25 %.

Com relação ao experimento de controle negativo, sem enzimas, a reação de produção de glicose não foi desprezível e em 72 h chegou a 18,4 g/L. Este fato provavelmente se deve ao poder autoamilolítico, já que em especial grãos de cereais nativos (milho, trigo e centeio) podem conter atividades autoamilolíticas, principalmente devido às α - e β -amilases (ROEHR, 2001).

5.4 Estudo e seleção de linhagens de levedura

Como primeira etapa no desenvolvimento de um processo para produção de etanol, sendo *Saccharomyces cerevisiae* o principal agente utilizado em bioconversões de glicose em etanol, foi realizado um estudo comparativo de diferentes linhagens desta levedura, incluindo cinco diferentes linhagens geneticamente modificadas e a cepa industrial JP1.

5.4.1 Estudo com as linhagens recombinantes

Cinco cepas geneticamente modificadas foram avaliadas quanto a seus perfis de crescimento em meio amido e capacidade fermentativa em um meio contendo amido como única fonte de carbono, para comparação com a cepa (não recombinante) industrial JP1.

As cinco cepas de levedura recombinantes são linhagens MFL de *S. cerevisiae* (descritas em 4.3.2.3), denominadas A2, B5, alfa-aglutinina, alfa-amilase e glucoamilase em função das respectivas modificações genéticas realizadas em cada uma. As Figura 5.20 e Figura 5.21 mostram os perfis cinéticos de crescimento destas cepas e da cepa JP1, em meio YPS2 contendo 18 g/L de amido e 2 g/L de glicose (para garantir um crescimento inicial) como fontes de carbono. O meio conta ainda com 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura.

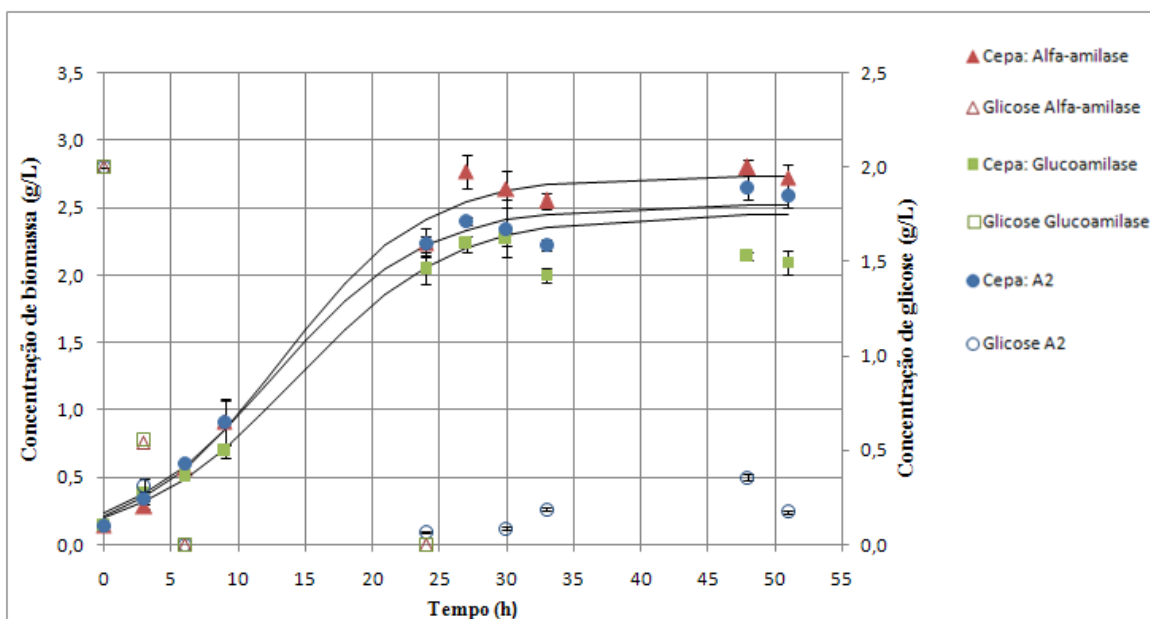


Figura 5.20: Perfis cinéticos de crescimento em meio amido YPS2. Cepas recombinantes alfa-amilase, glucoamilase e A2.

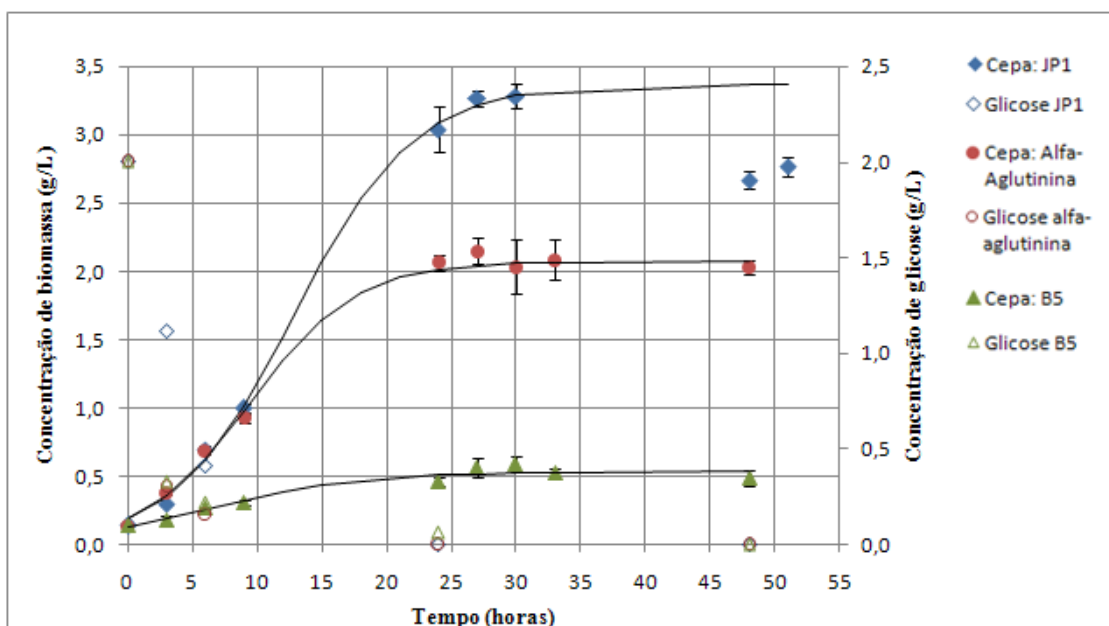


Figura 5.21: Perfis cinéticos de crescimento em meio amido YPS2. Cepa JP1 e as cepas recombinantes alfa-aglutinina e B5.

Todas as cepas recombinantes apresentaram crescimento celular ligeiramente acima de 2 g/L de biomassa (massa seca), com exceção da cepa B5 (genes de α -amilase e glucoamilases fusionados), que apresentou fraco crescimento neste meio. É interessante notar que após 24 h de crescimento já não havia mais glicose disponível, porém a cepa A2 apresentou após 30 h um aumento na concentração de glicose, indicando possivelmente a ação das enzimas produzidas por esta levedura sobre o amido, convertendo-o em glicose, sendo acumulada no meio e logo em seguida sendo consumida. Este fato também foi observado por ALTINTAŞ *et al.* (2002), com uma cepa similar em cultivo com amido como fonte de carbono.

As cinco linhagens recombinantes e a cepa industrial foram submetidas a experimentos de fermentação alcoólica em um meio com o amido como única fonte de carbono (YPS10). As Figura 5.22 e Figura 5.23 mostram os perfis cinéticos para a degradação do amido e fermentação alcoólica para experimentos sem adição de glicose.

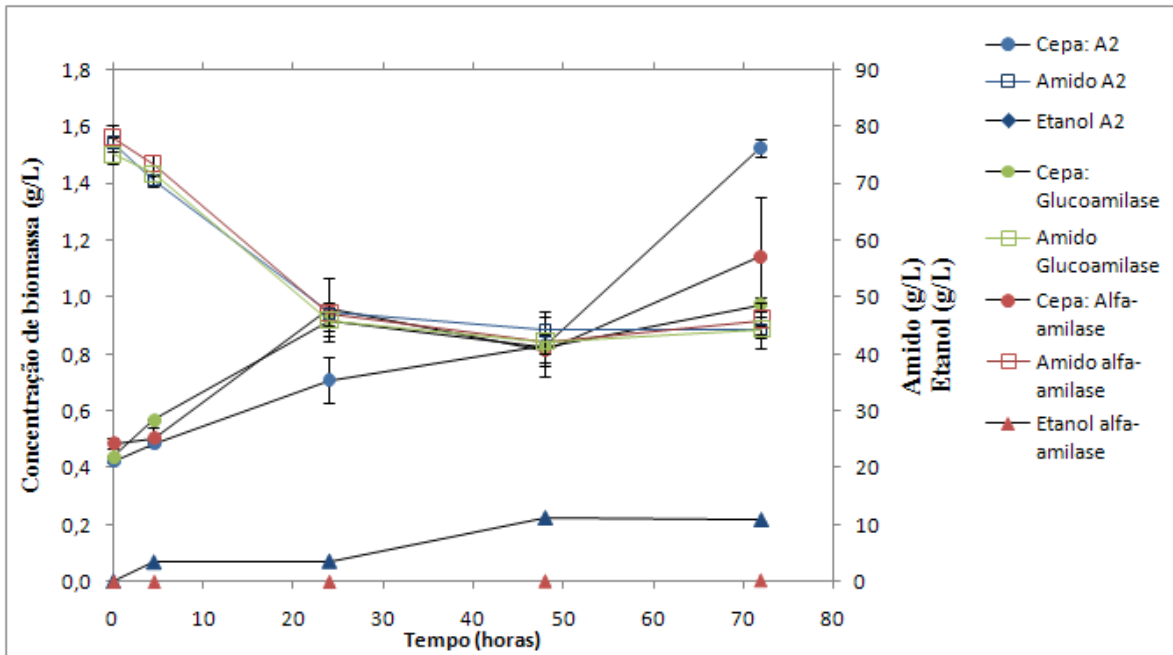


Figura 5.22: Fermentação em meio Amido (YPS10). Cepas recombinantes alfa-amilase, glucoamilase e A2.

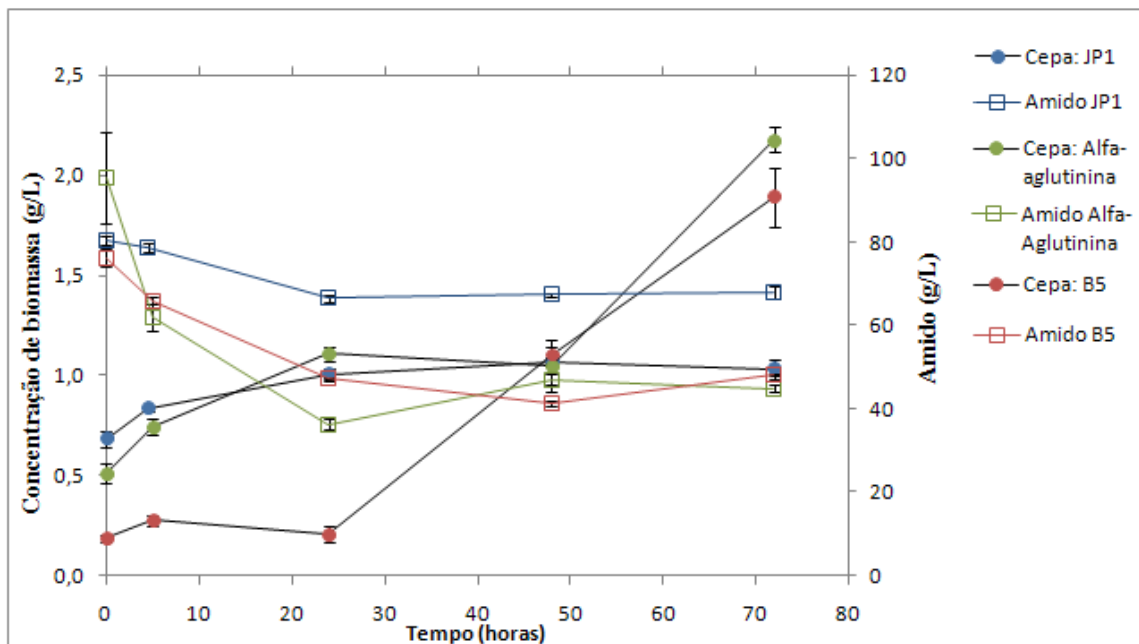


Figura 5.23: Fermentação em meio Amido (YPS10). Cepas JP1 e cepas recombinantes alfa-aglutinina e B5.

A cepa JP1 representa o controle negativo destes experimentos, já que não possui capacidade de metabolizar o amido. À exceção desta, observou-se que todas as outras cepas testadas apresentaram crescimento neste meio, sendo que cerca de 50 %

do amido inicialmente presente foi consumido até o fim das fermentações. Apesar da capacidade de metabolizar o amido em solução, apenas a cepa A2 (que produz α -amilase e glucoamilase) foi capaz de converter o amido em etanol. Esta cepa consumiu 36 g/L de amido (de 80 até 44 g/L) e produziu 11 g/L de etanol, enquanto a cepa α -amilase não apresentou quantidade significativa de etanol. Os valores de etanol produzidos pelas outras cepas foram medidos, porém, foram iguais a zero. Assim, para uma melhor visualização no gráfico, os dados de etanol para as cepas Glucoamilase, B5, Alfa-aglutinina e JP1 sequer foram inseridos no gráfico.

Portanto, dentre as cepas geneticamente modificadas, a única capaz de produzir etanol diretamente do amido foi a A2, apresentando um rendimento (Y_p/s) de 0,34 g etanol / g amido e 59,9 % de eficiência de conversão.

5.4.2 Estudo com a cepa industrial de levedura

Nesta seção, foram realizados testes com a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* JP1, uma linhagem industrial de alta capacidade de fermentação e mais resistente aos estresses ambientais (SILVA-FILHO *et al.*, 2005). A Figura 5.24 mostra o comportamento cinético de crescimento desta cepa industrial em meio YPD (descrição na seção 4.3.2.2), acompanhando o aumento da biomassa celular e o consumo de substrato (glicose). Outras diferentes condições foram previamente avaliadas (dados não mostrados), tendo sido adotadas para este estudo as condições que haviam propiciado maior crescimento celular (32 °C, 250 rpm e maior disponibilidade de aeração). Com a finalidade de caracterizar o crescimento desta cepa e estabelecer a etapa de propagação do inóculo de levedura, foi utilizado um modelo logístico (Eq. 4.4) para auxiliar no estudo do crescimento celular. A análise da Figura 5.24 permite identificar as diferentes fases do crescimento, apresentando uma curta fase lag (menos de 2 h), fase exponencial indo de 4 h até 18 h de cultivo e a fase estacionária de 18 h até 26 h. O ajuste do modelo foi realizado apenas até o tempo de 26 h (final da fase estacionária). A partir deste tempo, foi observada uma segunda fase de crescimento, caracterizado pelo fenômeno de diauxia, devido ao consumo de outros metabólitos presentes, como, por exemplo, o etanol produzido e posteriormente

consumido na ausência de glicose (em 18 h havia 5,74 g/L de etanol e ao final dos ensaios não havia mais etanol presente no meio de cultivo).

O ajuste do modelo não linear apresentou um coeficiente de determinação de $R^2=0,991$. A taxa específica de crescimento (μ) foi estimada a partir do modelo utilizado em $(0,302 \pm 0,017)$ 1/h, que representa um tempo de duplicação celular 2,3 h. O rendimento de células por substrato ($Y_{x/s}$) foi de 0,402 (g/g).

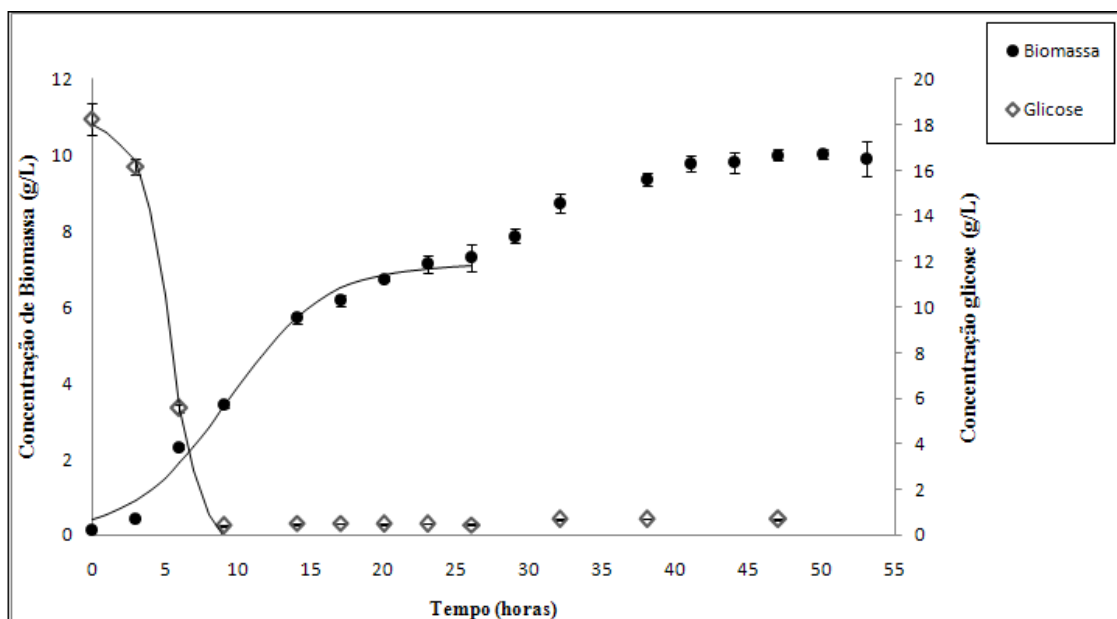


Figura 5.24: Perfil cinético de crescimento da cepa JP1 em meio YPD a 32 °C, 250 rpm.

Crescimento de biomassa celular e consumo de glicose. Os experimentos de fermentação foram realizados em duplicata. As barras de erro representam uma unidade de desvio padrão.

Com as informações obtidas, foi definido como 18 h o tempo de propagação a ser adotado, sob as condições padronizadas descritas em 4.3.2.2. Testes para avaliar a capacidade de fermentação e influência das fontes nutricionais da cepa industrial JP1 foram realizados sobre diferentes composições de meios “YPD” (*Yeast extract, Peptone and Dextrose*), variando as proporções de carbono e nitrogênio, provenientes dos componentes glicose, peptona e extrato de levedura. A Figura 5.25 mostra os perfis cinéticos dos cinco diferentes experimentos, enquanto a Tabela 5.8 apresenta a descrição das cinco condições e resume os resultados dos ensaios de fermentação com a cepa JP1, obtidos após 48 h de reação. Segundo a Figura 5.25 os perfis de consumo de glicose foram muito próximos entre si (em 24 h toda glicose havia sido consumida) e a concentração celular variou de 3,3 g/L até 6,4 g/L.

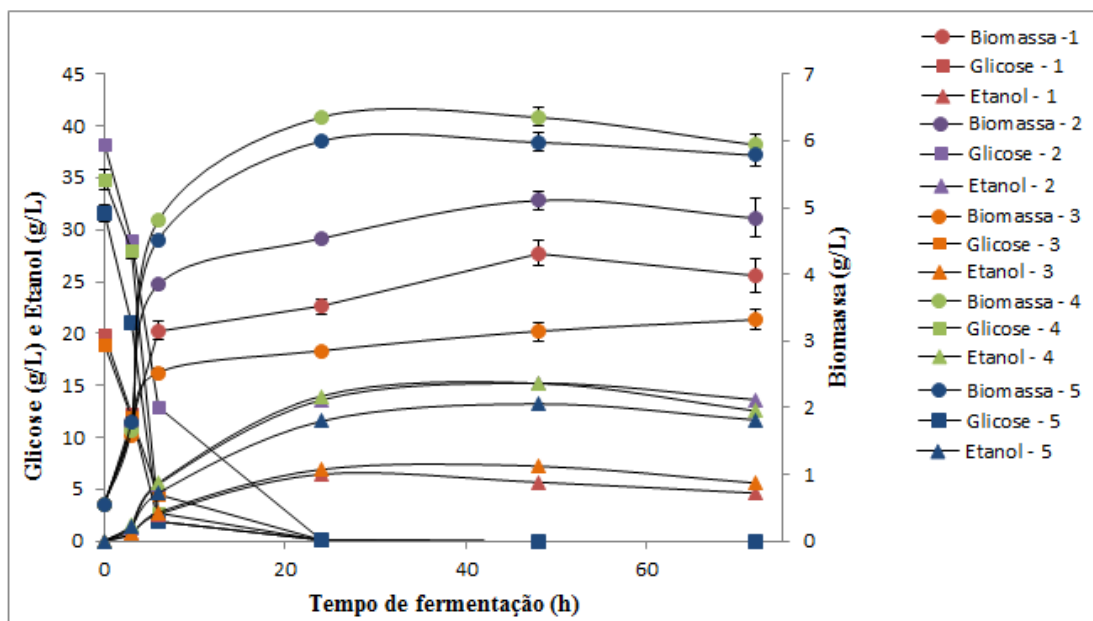


Figura 5.25: Cinética de crescimento, de consumo de glicose e formação de etanol para a cepa JP1 em diferentes meios.

Tabela 5.8: Condições e respostas obtidas em experimentos variando composição dos meios de fermentação para a cepa JP1.

Experimento		1	2	3	4	5
Condições Iniciais	Glicose inicial (g/L)	20	50	20	50	35
	Peptona (g/L)	20	25	10	50	30
	Extrato de Levedura (g/L)	10	12,5	5	25	15
	FAN _{inicial} (mg/L)	1215	1191	649	2182	1655
	FAN _{final} (mg/L)	787	869	470	1763	1311
Respostas	Etanol (g/L)	5,67	15,22	7,22	15,20	13,22
	Rendimento (Y _{x/s})	0,28	0,30	0,36	0,30	0,42
	Rendimento (Y _{p/s})	0,12	0,32	0,15	0,32	0,28
	Produtividade (g/(L.h))	10,22	25,55	10,22	25,55	17,89
	Eficiência de Fermentação (%)	55,46	59,55	70,61	59,50	73,90

Os dados presentes na Tabela 5.8 mostram que a eficiência de fermentação variou de 55,5 % até 73,9 %, não sendo possível observar nenhuma correlação da mesma com a concentração inicial de nitrogênio (FAN), que variou em função da composição dos meios. É importante notar que o consumo de FAN não diferiu

significativamente entre os experimentos, situando-se na faixa de 180 a 430 mg/L. Este consumo de FAN apresenta coerência com os dados da literatura, uma vez que valores de concentração de FAN entre 300 e 400 mg/L foram consumidos ao longo de diferentes experimentos de produção de etanol (ARIFEEN *et al.*, 2009).

Experimentos comparativos entre duas diferentes formas de condução de fermentação em meio com 35 g/L de glicose, 30 g/L de peptona e 15 g/L de extrato de levedura (condição 5 do experimento anterior) foram realizados. O objetivo foi investigar a influencia da aeração sobre a fermentação alcoólica, avaliando-se uma maior disponibilidade de oxigênio em um sistema com uma rolha permeável a gases (1) em comparação com uma menor disponibilidade de ar em um sistema que impede a entrada de ar (*air lock*), mas permite a liberação de gás carbônico (2). A Figura 5.26 mostra o consumo de glicose, o crescimento celular e a produção de etanol ao longo de 72 h de fermentação. Para estes experimentos a disponibilidade foi um pouco maior do que nos ensaios anteriores, pois foi adotado um menor volume de trabalho e uma maior agitação (170 rpm). Pode-se perceber que a condição 1, com maior aeração, propiciou um maior crescimento celular e assim diminuiu o rendimento de glicose em etanol (63 % de eficiência de fermentação). Após de 24 h de fermentação, a condição 1 apresentou uma fase de diauxia, consumindo parte do etanol produzido. A condição 2, realizada sob aeração menos intensa, apresentou menor crescimento celular e maior rendimento em etanol ($Y_{p/s}=0,46$), com eficiência de fermentação de 90 %.

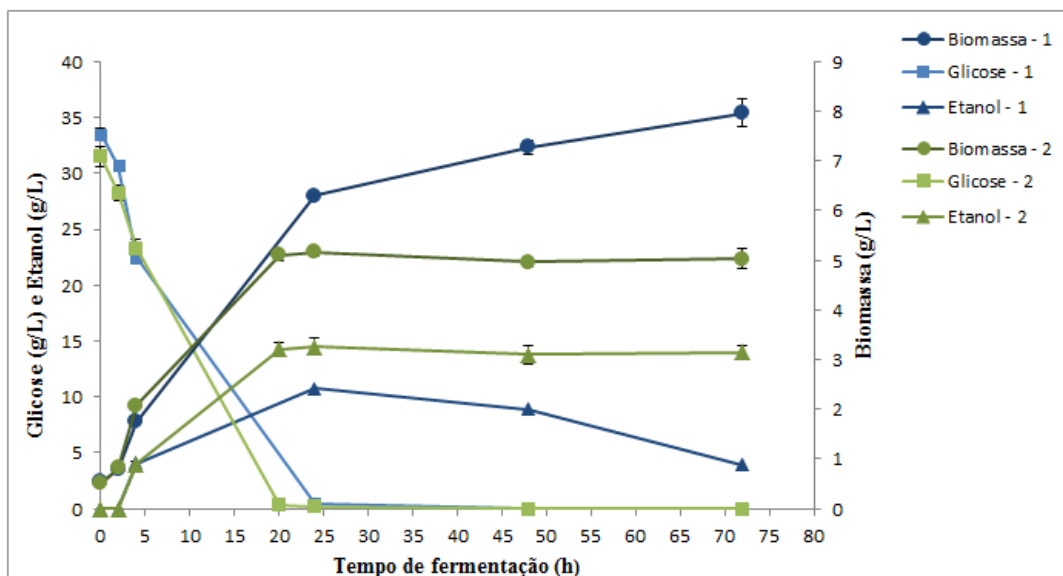


Figura 5.26: Estudos de fermentação em meio YPD cepa JP1. Condição 1: frascos com rolha vazada. Condição 2: frascos com sistema *air lock*.

O consumo da fonte de nitrogênio fornecida, expressa em concentração de FAN, ao longo destes ensaios pode ser observado na Figura 5.27. As duas condições resultaram em um mesmo comportamento, em que após 24 h não há mais consumo de nitrogênio. O FAN consumido nesse tempo foi de aproximadamente 400 mg/L em ambos os experimentos. Portanto, as diferenças na disponibilização de aeração não acarretaram diferença significativa sobre consumo de FAN.

Como não houve medição do teor de oxigênio dissolvido, não se pode inferir mais sobre a influência da aeração sobre a fermentação alcoólica. Na condição 1 o sistema apresenta uma reposição do oxigênio no interior do frasco reacional, tendo em vista que a rolha utilizada é permeável aos gases, enquanto na condição 2, o gás oxigênio está disponível apenas no início da fermentação, porém ao longo do cultivo são mantidas condições de anaerobiose.

A condição 2 foi selecionada para a realização de todos os próximos experimentos de produção de etanol. Esta apresentou melhor eficiência e ainda representa possíveis vantagens econômicas em maior escala, não necessitando de aeração forçada.

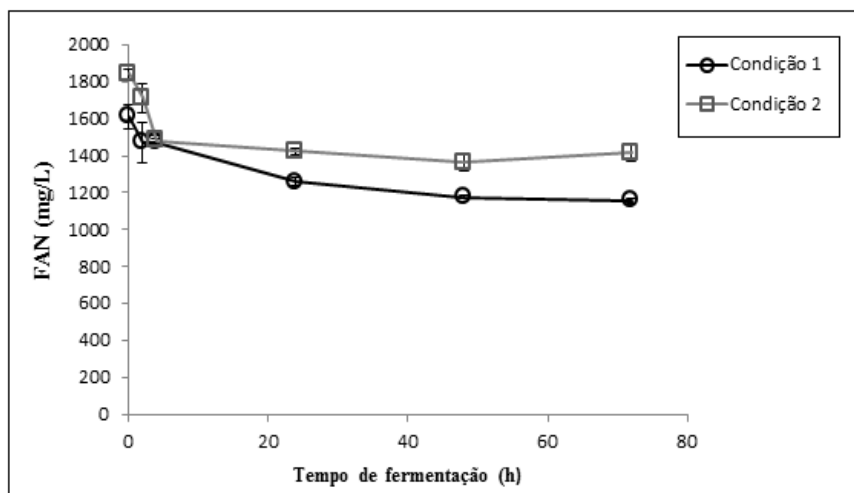


Figura 5.27: Consumo de FAN durante fermentação em meio YPD cepa JP1. Condição 1: frascos com rolha vazada. Condição 2: frascos com *air lock*.

5.5 Avaliação de estratégias de SSF

Com base nos estudos de hidrólise do amido granular e nas investigações com as cepas de levedura e as diferentes condições de fermentação, foi possível a avaliação e o desenvolvimento de um processo de Sacarificação Simultânea à Fermentação (SSF) sobre o amido granular, visando à produção de etanol.

Os estudos de hidrólise da farinha de babaçu foram desenvolvidos especificamente para produção de um meio completo de cultivo, com alta concentração de glicose e nitrogênio, tendo-se determinado que as condições iniciais de 190 g/L, 20 U/mL e pH=4,8 apresentaram os melhores resultados. Portanto, estas condições foram mantidas ao longo dos experimentos de SSF para a farinha de babaçu.

Todos os inóculos propagados de levedura foram adicionados ao meio de fermentação a uma concentração de 10% (v/v), porém com diferentes concentrações de biomassa, resultando em concentrações iniciais de células após a inoculação que variaram entre 0,4 e 4,5 g/L de massa seca. Devido às condições do processo, com alto teor de sólidos insolúveis, não foi possível o acompanhamento de crescimento celular ao longo dos experimentos (com exceção do experimento de SHF). O método de quantificação com base na massa seca de células presentes no meio torna-se impraticável quando na presença dos sólidos insolúveis, inclusive porque o teor de

sólidos ainda varia ao longo da fermentação. Além disso, os sólidos interferem inclusive na visualização por microscopia em câmara de Neubauer.

Com relação ao preparo das enzimas (dissolução do extrato liofilizado em água) e ajuste de pH (não necessário para o extrato enzimático), a metodologia foi a mesma mencionada nos ensaios anteriores. Diferentemente dos ensaios de hidrólise, para os experimentos de SSF a adição de azida sódica não foi utilizada devido à inibição do crescimento da levedura que a mesma causaria. Portanto, como os meios de cultivo não foram esterilizados, buscou-se trabalhar ao máximo sob condições assépticas.

Neste estudo de produção de etanol, três diferentes estratégias foram avaliadas. Nessa etapa, as enzimas atuam sobre o amido produzindo glicose em um processo de hidrólise, enquanto as células de levedura metabolizam seu substrato (glicose) produzindo o etanol, em um único vaso reacional.

As três estratégias adotadas no desenvolvimento de SSF com o uso do extrato enzimático e teste comparativo entre as cepas JP1 e A2 (recombinante) foram as seguintes:

- **Estratégia I.** Essa estratégia foi desenvolvida ao final dos estudos de hidrólise do amido granular e apresentou maior produção de glicose. Foi realizada com uma etapa de hidrólise inicial (Pré-SSF) a 50 °C por 4 h, quando então a temperatura foi reduzida para 32°C, a levedura foi inoculada e a fermentação foi mantida a 32 °C por até 72 h. A estratégia I com a cepa JP1 foi realizada também com o Stargen™ 002, promovendo mais uma comparação de desempenho, agora tendo como resposta final a conversão em etanol;
- **Estratégia II.** Essa estratégia foi idealizada com intuito de reduzir o tempo da etapa de fermentação (SSF). Para tal, adotou-se um inóculo mais alto de levedura de 4,5 g/L em massa seca (nove vezes maior que os demais) e uma hidrólise inicial mais longa com 4 h a 50 °C e 44 h a 32 °C, sendo a etapa de SSF mais curta, durando no máximo 24 h;
- **Estratégia III.** Essa estratégia foi realizada com todo experimento de SSF a 32 °C por até 72 h.

Adicionalmente, foram realizados também outros três conjuntos de experimentos com o extrato enzimático e a cepa JP1:

- **Etanol de milho.** A estratégia I aplicada sobre o milho, buscando-se uma comparação com a literatura e ainda, assim como uma maior caracterização do potencial do extrato enzimático;
- **Estratégia de SHF,** com as etapas de hidrólise e fermentação ocorrendo separadamente, possibilitando uma comparação com o processo SSF;
- **Estratégia IV,** ou estratégia de batelada alimentada. Similar às condições descritas em estratégia I, porém com 4 alimentações de farinha de babaçu equivalentes cada uma a 10% da massa inicial adotada. As adições foram realizadas nos tempos de 1 h, 2 h e 4 h de pré-SSF e em 24 h de fermentação.

Os resultados e as discussões foram divididos em duas seções, a primeira contendo todos os gráficos e perfis cinéticos de consumo e produção dos processos avaliados, assim como uma discussão parcial sobre estes resultados. A segunda apresenta um apanhado geral de todos os resultados e parâmetros de resposta obtidos.

5.5.1 Perfis cinéticos de resposta

5.5.1.1 Estratégia I

A Figura 5.28 mostra os perfis cinéticos da concentração de glicose (produção e consumo), glicerol e produção de etanol, enquanto a Figura 5.29 mostra a produção e consumo de FAN ao longo do processo de SSF (**estratégia I**). Os experimentos foram realizados com as cepas JP1 e A2, ou sem a presença de levedura (experimento de controle negativo da fermentação). Como são mostrados apenas os dados de SSF, ou seja, após a inoculação, a etapa de pré-SSF, com duração de 4h, não é mostrada, porém resulta dela a concentração inicial de glicose entre 42 e 43 g/L observada na Figura 5.28.

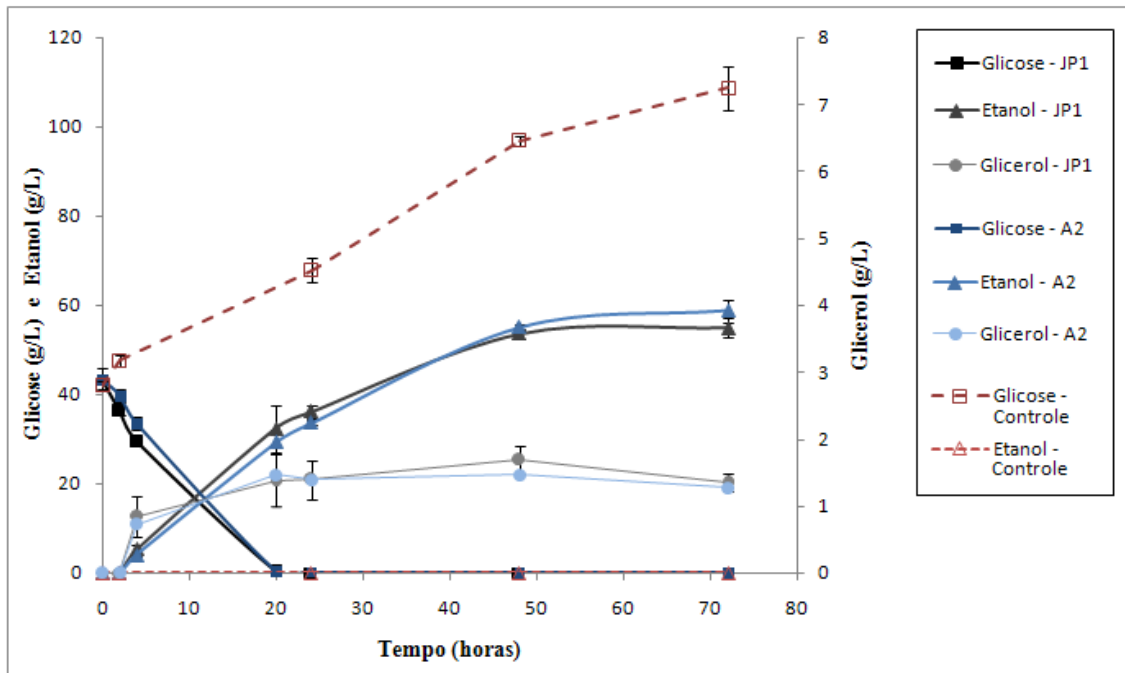


Figura 5.28: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia I. Cepas JP1 e A2, ou sem levedura (controle).

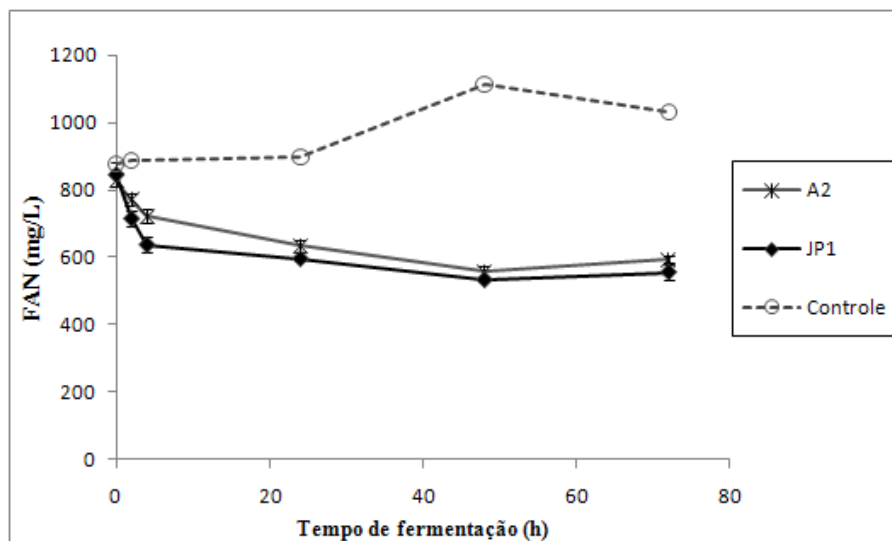


Figura 5.29: Produção e consumo de FAN ao longo do processo SSF – Estratégia I. Cepas JP1 e A2, ou sem levedura (controle).

Dos resultados, pode-se observar que o comportamento das duas cepas de levedura foi equivalente, tanto em relação ao consumo de glicose e FAN quanto à produção de glicerol e etanol. Isto indica que a levedura recombinante não ofereceu nenhuma vantagem comparativa para este processo. Em 48 h o processo estava praticamente finalizado, não havendo mais alterações significativas nas respostas. A

cepa A2 ainda apresentou um leve aumento entre 48 h e 72 h, de 55,0 g/l para 58,7 g/L, o que pode representar uma cinética um pouco mais lenta desta cepa em relação à JP1.

A glicose inicial foi consumida, sendo que em 20 h de fermentação sua concentração caiu a aproximadamente zero para as duas cepas, permanecendo assim até o fim do processo. Com base nisto, pode-se inferir que, a partir deste tempo de processo, as taxas de produção e de consumo de glicose se mantiveram em níveis equivalentes, resultando em uma condição próxima de estado estacionário, ao menos em relação à glicose, uma vez que não houve variação na concentração de glicose ao longo do tempo. Com 20 h de fermentação a concentração de etanol produzido pela cepa JP1 era de 32,3 g/L e em 48 h era de 53,6 g/L, mostrando que houve consumo de glicose mesmo sem acúmulo de glicose no meio, confirmando que a levedura rapidamente convertia em etanol a glicose continuamente produzida pela hidrólise.

Uma característica observada para este processo foi uma leve queda do pH ao longo da fermentação, do nível inicial igual a 4,8 para 4,4 após 72 horas. Durante a fermentação, prótons são excretados pela levedura, ocasionando um declínio de pH nos meios. Segundo RUSSELL (2003), em processos industriais, o mosto de destilaria pode partir de um pH inicial de 5,2-5,5 e cair até 4,0-4,5.

O experimento de controle nada mais é do que uma reprodução dos experimentos de hidrólise nestas condições (conforme realizado na seção 5.3.5). A linha de resposta tracejada representa a concentração de glicose ou FAN presente, sem que haja o consumo pela levedura. Pode-se constatar que, como esperado, não houve a produção de etanol (valores de glicerol não constam no gráfico, mas foram igualmente nulos).

Com relação ao glicerol produzido, subproduto da fermentação alcoólica, envolvido no balanço redox da célula, este foi produzido em menor quantidade do que reportado na literatura. ALFENORE *et al.* (2004) reportaram valores entre 4 e 12 g/L de glicerol acumulados na produção de etanol convencional com *S. cerevisiae* em diferentes condições de aeração em escala de laboratório. Segundo RUSSEL (2003), na produção Industrial de etanol combustível pela via seca, as concentrações de glicerol podem chegar até 15 g/L. Nos experimentos do presente trabalho, a concentração de

glicerol alcançou no máximo 1,7 g/L (em 48 h). A menor a produção deste subproduto é desejável, tendo em vista que sua formação desvia parte do metabolismo da glicose para o glicerol, diminuindo assim o rendimento em etanol.

Os perfis de produção e consumo de FAN apresentados na Figura 5.29 mostram que as cepas JP1 e A2 consumiram 313 mg/L e 272 mg/L, respectivamente. Esses valores são um pouco inferiores aos obtidos nos testes de fermentação apresentados na Figura 5.27, em que o consumo chegou até 420 mg/L de FAN. Esta diferença pode estar associada ao consumo de parte do FAN produzido ao longo da hidrólise, que conforme discutido em 5.3.5 possui eficiência de conversão de proteína em aminoácidos de até 25 %.

Vale notar ainda que, após 48 h de fermentação, houve leve aumento na concentração de FAN. Tal fato se deve provavelmente à fase de morte celular, em que o aumento de FAN provocado pela liberação de aminoácidos no meio pode ser atribuído à lise das células de levedura (ARIFEEN *et al.*, 2009). Este fenômeno levou a um aumento na concentração de FAN no fim de todas as fermentações realizadas. Segundo NOVO *et al.* (2005), o nitrogênio é consumido principalmente nas primeiras 24 horas de fermentação, devido ao fato que as células de levedura não utilizam efetivamente o nitrogênio após a fase exponencial de crescimento. Portanto, os perfis de consumo de FAN podem representar indiretamente o perfil de crescimento celular da levedura ao longo das fermentações.

Ainda com a estratégia I foi realizado experimento de SSF com a cepa de levedura JP1 e o produto comercial Stargen™ 002 ao invés do extrato enzimático, sob as mesmas condições. A Figura 5.30 mostra os perfis de produção e consumo de glicose, produção de etanol e consumo de FAN no mesmo gráfico. Os valores de glicerol foram omitidos, mas chegaram ao máximo de 1 g/L. Para efeito de comparação e melhor visualização, foi adicionado a este gráfico a curva de produção de etanol do experimento da cepa JP1 (presente na Figura 5.28), com o extrato enzimático (linha tracejada).

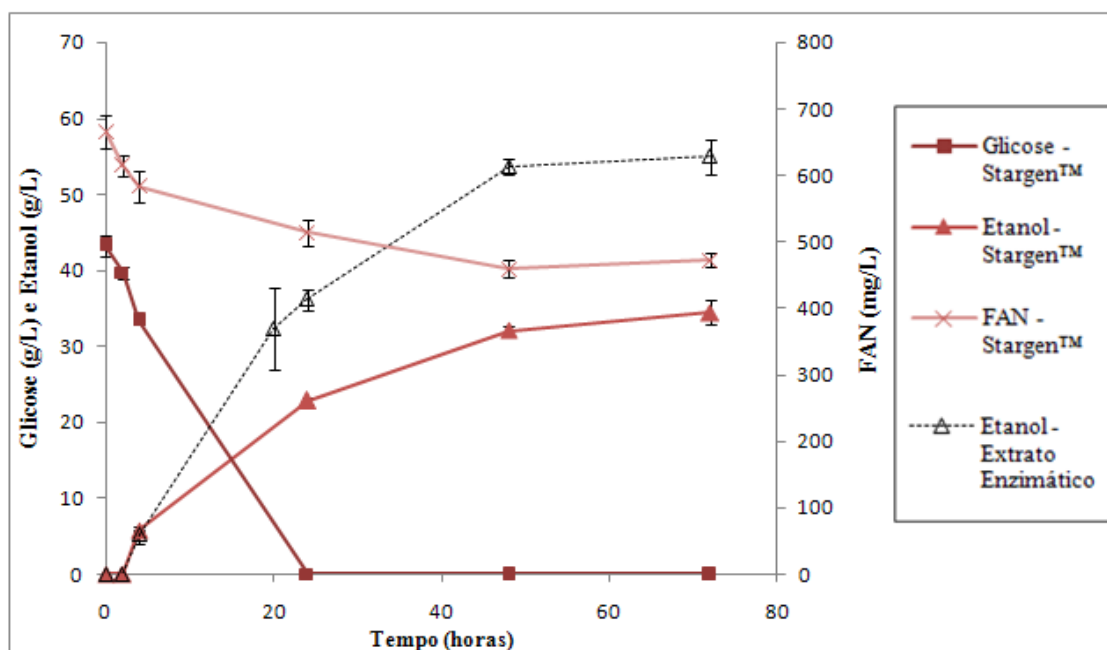


Figura 5.30: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia I. Cepa JP1 com Stargen™ 002. Curva com linha tracejada: produção de etanol com extrato enzimático.

O preparado comercial Stargen™ 002, diferentemente do extrato enzimático próprio, carece de adição de uma fonte de nitrogênio. Portanto, conforme descrito na seção 4.5.4.2, foram adicionados peptona e extrato de levedura de forma a garantir a mesma concentração inicial de FAN, e foi usado ácido sulfúrico para ajuste do pH para 4,8.

A produção de etanol no processo com Stargen™ 002 foi significativamente inferior ao processo com o extrato enzimático: em 48 h havia (32,1 ± 1,1) g/L de etanol contra (53,6 ± 1,1) g/L de etanol com o extrato, sob as mesmas condições. Apesar da diferença na produção de etanol, os perfis cinéticos de consumo de glicose e FAN foram semelhantes, os quais se devem principalmente às características da levedura, que é a mesma.

Mais uma vez comprovou-se o desempenho superior do extrato próprio em relação ao preparado Stargen™ 002. Adicionalmente, a necessidade de suprimento de fonte adicional de nitrogênio e de ajuste de pH consiste em desvantagens para o preparado comercial, uma vez que para o extrato utilizou-se apenas enzima (extrato) e água, além de farinha e levedura.

5.5.1.2 Estratégia II

A **estratégia II** de SSF foi realizada após 48 h de hidrólise com extrato enzimático (sendo 4 h a 50 °C e 44 h a 32 °C). A Figura 5.31 mostra, a partir da inoculação do sistema com a levedura (cepas JP1 ou A2), os perfis de produção e consumo de glicose e FAN, além da produção de etanol, por até 24 h.

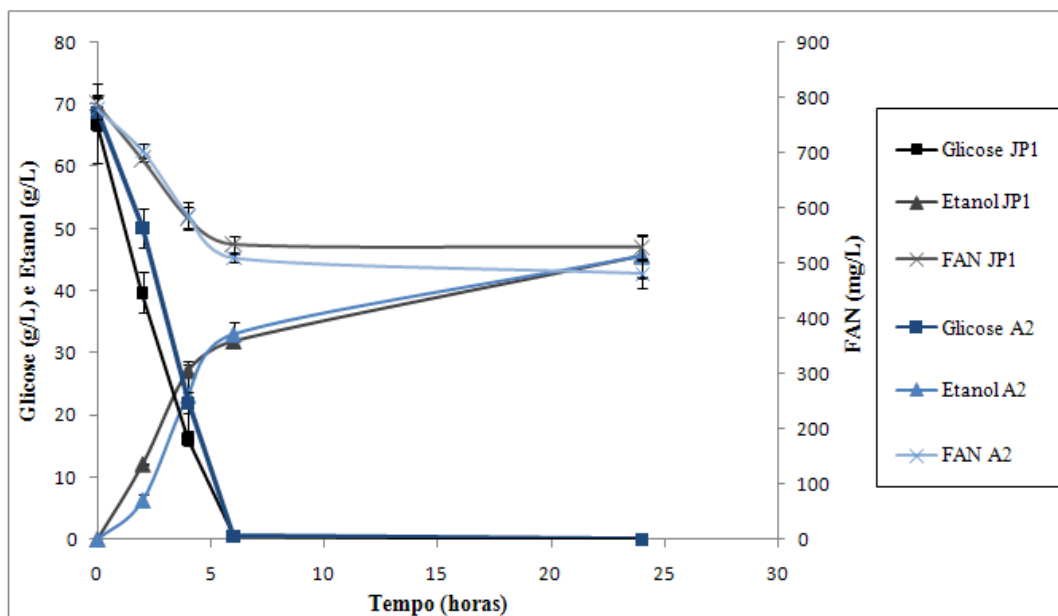


Figura 5.31: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia II. Cepas JP1 e A2.

Esta estratégia, com concentração de inóculo de levedura mais alta e partindo de uma concentração de glicose mais elevada (entre 66 e 69 g/L), permitiu que as células convertessem mais rapidamente a glicose disponível em etanol. Em apenas 6 h de fermentação toda glicose inicial foi consumida e a produção de etanol atingiu cerca de 30 g/L para ambas as cepas. De 6 h até 24 h as taxas de produção de etanol foram mais baixas, obtendo-se no máximo ($45,6 \pm 3,5$) g/L de etanol. O consumo de FAN também cessou após as 6 h de fermentação, quando provavelmente não houve mais aumento de biomassa, ou seja, iniciou-se a fase estacionária de crescimento celular.

Na comparação entre as duas cepas, os resultados foram praticamente idênticos, apresentando o mesmo comportamento sem qualquer distinção significativa.

5.5.1.3 Estratégia III

A Figura 5.32 mostra os perfis cinéticos de fermentação ao longo do processo SSF – **estratégia III**, monitorando a produção e consumo de glicose e FAN, além da produção de etanol, por até 72 h. Notar que, neste caso, a fermentação se inicia exatamente junto da hidrólise, pois não houve a realização da etapa de pré-SSF (como nas estratégias I e II). Por isso, os valores iniciais de concentração de glicose são próximos a zero (0,6 g/L). É interessante observar que durante as primeiras 2 horas de processo houve um aumento na concentração de glicose (taxa de produção maior do que consumo), mas após este tempo sua concentração decaiu até zero em 24 horas de reação. A produção de etanol foi de 6,6 g/L em 24 h e de 44,9 g/L em 48 h, indicando que houve produção e consumo de glicose durante esse intervalo, mesmo apresentando valores nulos de glicose. Desta forma, pode-se concluir que a partir de 24 h as taxas de consumo e produção de glicose foram equivalentes.

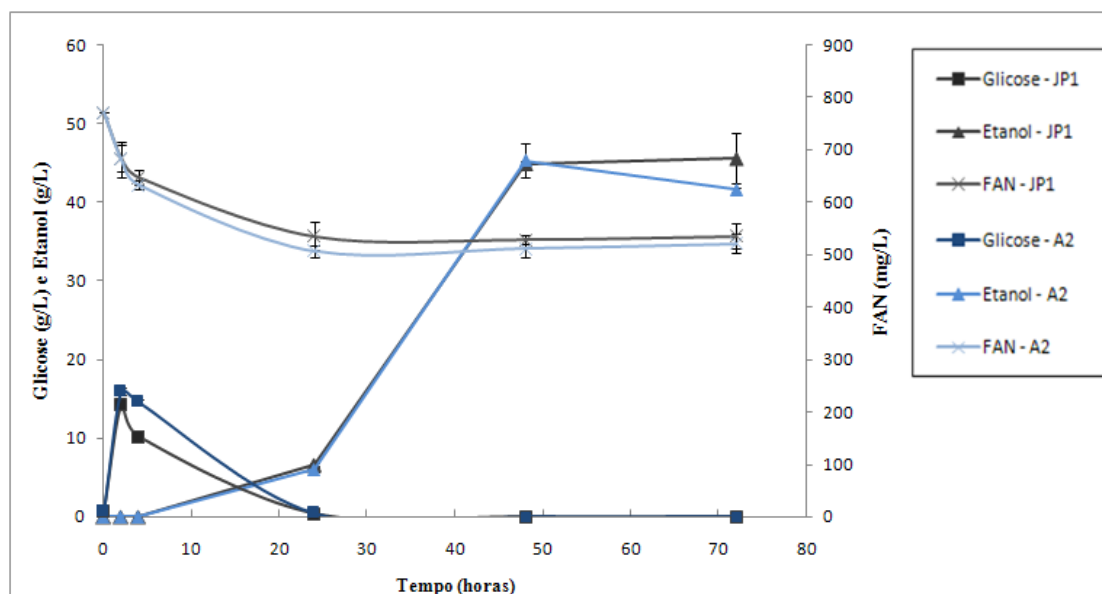


Figura 5.32: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia III. Cepas JP1 e A2.

Os perfis de consumo de FAN apresentaram o mesmo comportamento obtido com as duas estratégias anteriores e indicam que após 24 h provavelmente não houve mais aumento na concentração celular. Novamente as cepas JP1 e A2 apresentaram o mesmo comportamento.

A Figura 5.33 mostra um teste com a cepa recombinante A2, nas mesmas condições da estratégia III, porém sem adição de extrato enzimático. Como

anteriormente relatado, devido à ausência do extrato, faz-se necessário a adição de uma fonte de nitrogênio, da mesma forma como foi realizado no experimento com Stargen™, com uso de peptona e extrato de levedura de forma a garantir a mesma concentração inicial de FAN (800 mg/L). Entretanto, a cepa A2, sem adição das enzimas presentes no extrato, não foi capaz de crescer e produzir etanol adequadamente. As escalas do gráfico estão ajustadas, a fim de permitir uma melhor visualização. Os valores de produção de etanol foram muito baixos, de no máximo 1,8 g/L em 72 h. A concentração de glicose pouco variou e a concentração de FAN inclusive aumentou após 24 h, indicando possivelmente morte das células de levedura. Este resultado mostra que a cepa recombinante A2, capaz de produzir e excretar α -amilase e glucoamilase, não conseguiu se adaptar ao meio com somente amido granular como fonte de carbono e energia. Possivelmente, parte do amido da farinha de babaçu foi hidrolisado, porém estes valores de etanol produzidos foram muito inferiores aos encontrados nos experimentos com amido solúvel (Figura 5.22). Portanto, as enzimas heterólogas produzidas pela cepa A2 não foram suficientes e/ou capazes para atuar sobre o amido granular e por isso carecem das enzimas presentes no extrato enzimático.

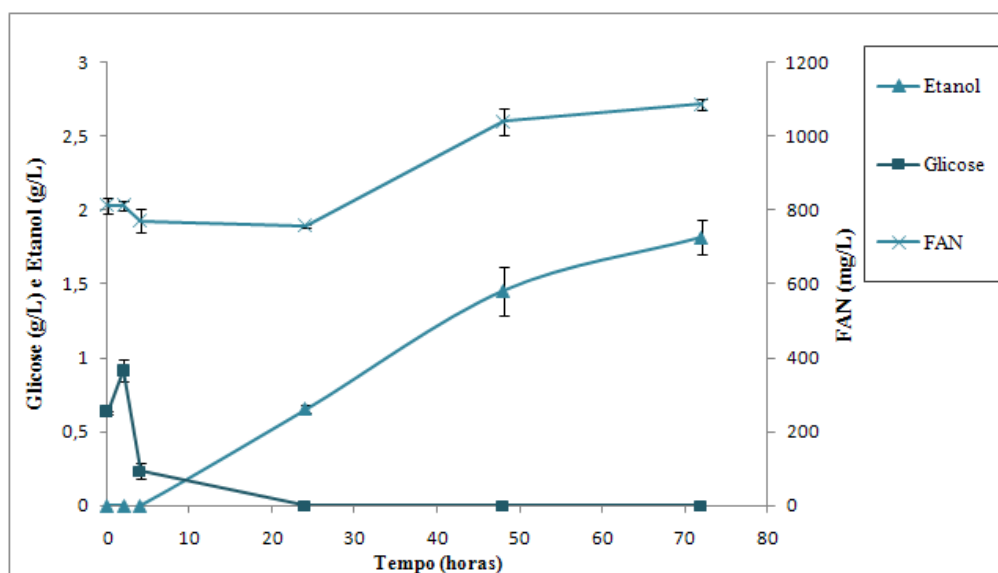


Figura 5.33: Perfis cinéticos do processo SSF – Estratégia III com a cepa A2 sem adição de enzima.

Outra observação diz respeito à formação de CO₂. Os sistemas de *air lock* permitem acompanhar a liberação de gás carbônico ao longo das fermentações, uma

vez que o *air lock* possui água em seu interior, permitindo visualizar o borbulhamento resultante da evolução de CO₂. Como o gás carbônico é um indicativo de metabolismo da levedura, alta liberação de CO₂ se deve ao elevado crescimento celular e/ou a elevadas taxas de produção de etanol. Em todos os experimentos de produção de etanol foi notado intenso borbulhamento logo a partir das primeiras horas de reação, com exceção deste experimento.

De uma forma geral, a levedura recombinante não ofereceu nenhuma vantagem comparativa para este processo de SSF em nenhuma das três estratégias elaboradas. Assim sendo, a cepa A2 não foi mais utilizada nos últimos experimentos de avaliação de SSF, dando-se prosseguimento apenas com a cepa JP1.

5.5.1.4 Etanol de milho por processo SSF

A estratégia I de SSF foi utilizada na produção de etanol do milho com a cepa JP1 e uso de extrato enzimático (Figura 5.34). Foi utilizada a farinha de milho amarela (descrita em 4.5.3.5) nas mesmas condições das utilizadas com farinha de babaçu (190 g/L de farinha de milho e 20 U/mL de atividade amilolítica). Cabe ressaltar que a concentração da farinha de milho utilizada foi inferior à usada no experimento de hidrólise do milho (seção 5.3.6), garantindo assim a mesma concentração de matéria-prima aos experimentos anteriores com babaçu (o teor de amido no milho é maior que no babaçu).

O tempo inicial indicado no gráfico da Figura 5.34 corresponde ao início do processo de SSF (após as 4 h de pré-SSF). Neste instante, a concentração de glicose era de $(82,0 \pm 1,9)$ g/L e havia $(1228,6 \pm 44,8)$ mg/L de FAN.

Em 24 horas o processo estava praticamente finalizado, portanto, em menos tempo do que observado com a farinha de babaçu nas mesmas condições. Com 24 h de fermentação a concentração de etanol produzido foi de $(78,0 \pm 1,4)$ g/L e o máximo de etanol de $(82,6 \pm 1,5)$ g/L foi obtido em 72 h. Os valores finais de etanol foram superiores àqueles obtidos em qualquer experimento com a farinha de babaçu e este fato se deve provavelmente à manutenção da mesma concentração inicial de farinha, mas não mesma quantidade de amido. O milho possui um teor de amido maior do que

a farinha de babaçu, assim possibilitando a obtenção de uma concentração final maior de etanol.

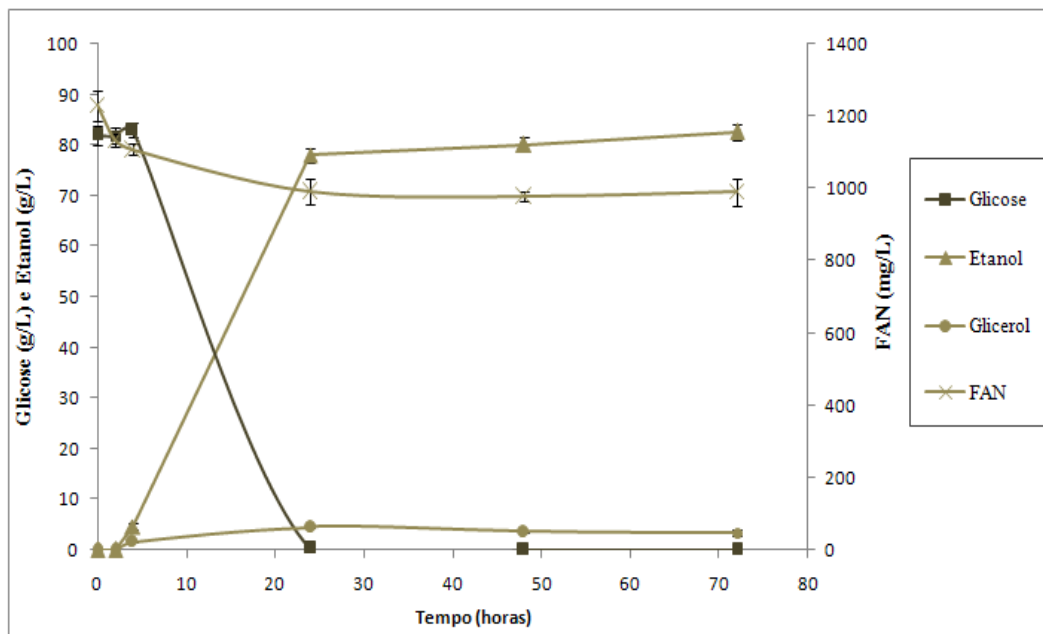


Figura 5.34: Perfis cinéticos da produção de etanol de milho processo SSF através da estratégia I com a cepa JP1 e extrato enzimático.

A produção de glicerol foi de 4,5 g/L em 24 h, sendo um pouco superior à obtida em farinha de babaçu. Com relação ao perfil de F/AN, obteve-se uma variação de 236 mg/L.

5.5.1.5 Produção de etanol por processo SHF

Visando a comparação de todos os experimentos de produção de etanol de farinha de babaçu por SSF com o processo convencional, foi realizado um estudo do processo SHF. Desta forma, primeiramente, foi realizada a etapa de hidrólise por 24 h a 50 °C e, em seguida, após remoção dos sólidos (descrição em 4.5.4.3), foi inoculada a levedura e iniciada a fermentação alcoólica. A Figura 5.35 mostra o consumo de glicose ao longo do tempo, a produção de glicerol e etanol, bem como o crescimento celular (devido ao meio límpido, sem a presença de sólidos, foi possível a quantificação de biomassa celular).

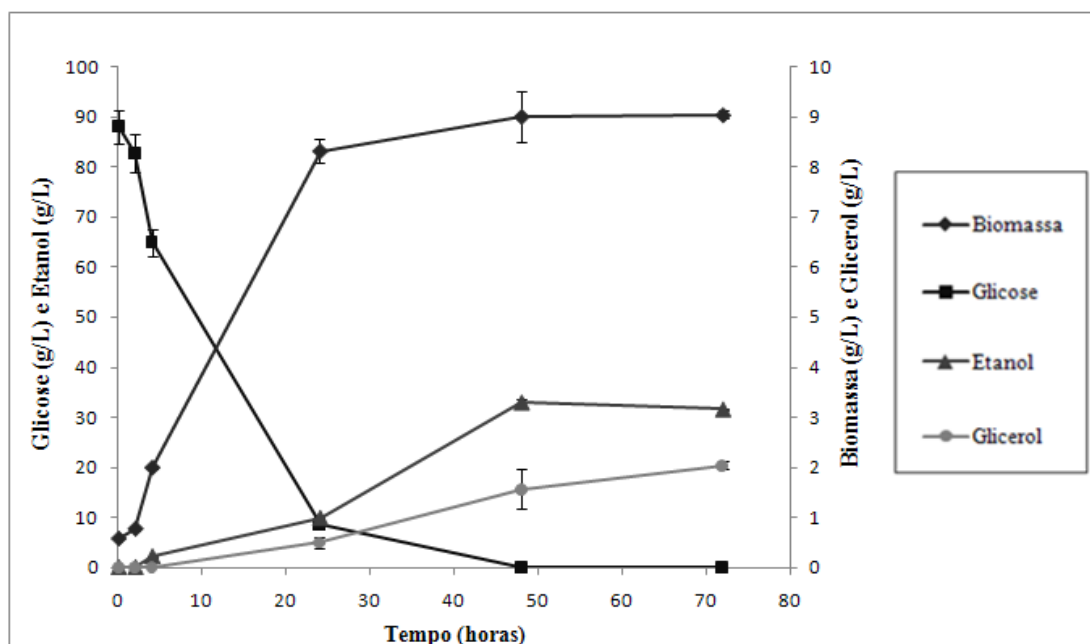


Figura 5.35: Perfis cinéticos da produção de etanol de farinha de babaçu por processo SHF com a cepa JP1 e extrato enzimático.

Após a etapa de 24 h de hidrólise (sacarificação) foi produzido um meio com $(88,1 \pm 3,3)$ g/L de glicose e $(934,5 \pm 27,0)$ mg/L de FAN. Após a separação sólido-líquido e a inoculação do sistema com levedura, não ocorre mais hidrólise, apenas a fermentação. A cinética de consumo de glicose foi um pouco mais lenta do que comparada ao processo SSF, sendo a mesma totalmente consumida apenas em 48 h.

Com a presença da curva de crescimento celular (biomassa), o perfil de variação da concentração de FAN foi omitido do gráfico, mas sua resposta foi similar ao comportamento apresentado pela cepa JP1 na Figura 5.29, sem maiores considerações. Assim como após 24 h de fermentação não há mais consumo de FAN, por este gráfico fica claro que a partir de 24 h as células entram na fase estacionária de crescimento, atingindo $(9,1 \pm 0,1)$ g/L de células em massa seca. Em 48 horas de fermentação foi produzido $(32,9 \pm 0,7)$ g/L de etanol. Portanto, além de uma cinética mais lenta, a produção final de etanol foi inferior ao processo SSF. Esses dados estão apresentados em forma de tabela na seção seguinte (5.5.2).

5.5.1.6 Batelada alimentada

Por último, buscou-se obter um meio com maior concentração final de etanol e, para tal, foi realizada a **estratégia IV** com uma condução similar à estratégia I, porém

em batelada alimentada. Previamente foi realizado um estudo de hidrólise da farinha de babaçu em batelada alimentada de farinha de babaçu, mostrado no apêndice C.

O objetivo das alimentações foi aumentar gradativamente a concentração de farinha de babaçu (amido) no sistema, porém sem impactar demais com alto teor de sólidos. Ao total, foram realizadas 4 alimentações de farinha, sendo que três ocorreram antes mesmo do “tempo zero” do gráfico da Figura 5.36, pois estas adições foram realizadas durante a pré-SSF. Uma última adição foi realizada com 24 h de fermentação. O processo foi praticamente finalizado em 48 h.

Todos os perfis de produção e consumo foram muito similares ao obtido com a cepa JP1 na estratégia I, entretanto o resultado mostra que, com o aumento de substrato, foi possível alcançar uma concentração final de etanol superior, com 59,2 g/L em 48 h. Em menos tempo também foi possível uma concentração maior do que na estratégia I, com 39,5 g/L de etanol em 24 h.

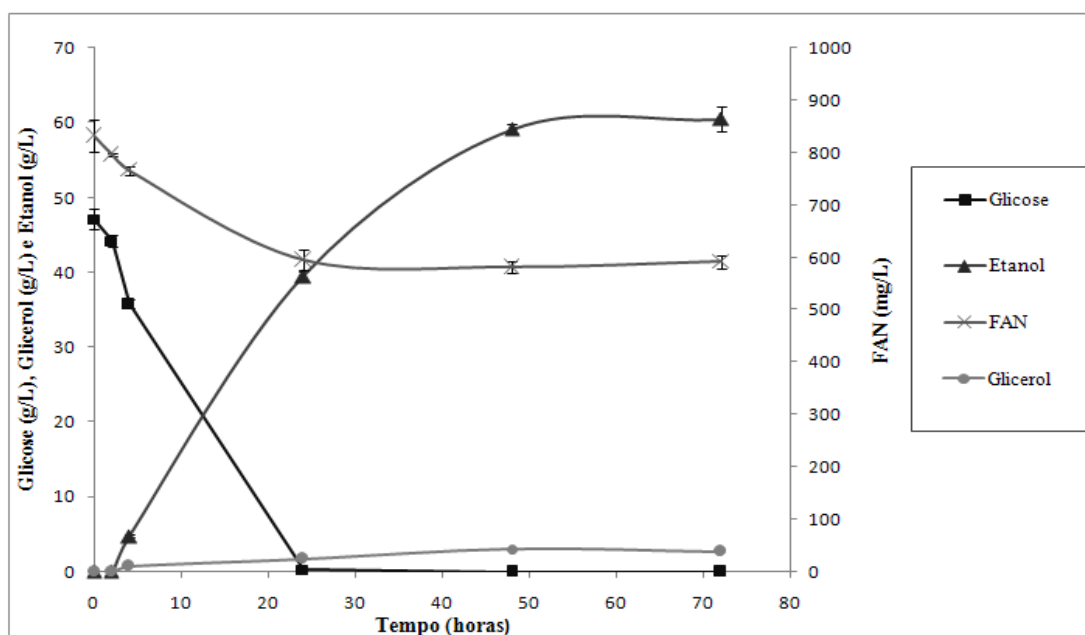


Figura 5.36: Perfis cinéticos da produção de etanol por batelada alimentada de farinha de babaçu com a cepa JP1 e extrato enzimático.

A produção de glicerol foi de 3,0 g/L em 48 h, portanto um pouco superior ao obtido na estratégia I, possivelmente devido à maior carga de sólidos presentes no meio e consequente maior resposta de estresse celular. Com relação ao perfil de

produção e consumo de FAN, foi obtida uma variação de 250 mg/L, praticamente a mesma faixa encontrada para todas as fermentações.

5.5.2 Avaliação global dos estudos de SSF e SHF

Com base nos resultados e discussões preliminares das diferentes estratégias avaliadas, esta seção engloba a síntese dos principais dados obtidos e preliminarmente discutidos na seção anterior, permitindo melhor discussão comparativa entres esses, bem como com dados da literatura sobre a produção de etanol a partir do amido granular.

A Tabela 5.9 apresenta as respostas obtidas para os experimentos realizados com a cepa JP1 e extrato enzimático na produção de etanol por SSF a partir do amido granular de farinha de babaçu. Apresenta ainda uma comparação com o uso de Stargen™ 002, com o processo SHF e com o uso de farinha de milho. Foram considerados os dados nos momentos que deixou-se de observar acréscimo significativo na produção de etanol, tendo sido considerado, portanto, o tempo de 24 h para o processo com milho e para a estratégia II e o tempo de 48 h para os demais. O rendimento (g etanol/g glicose) foi calculado a partir da massa de etanol obtida e da quantidade máxima possível de se obter de glicose a partir do amido, lembrando que o rendimento máximo teórico é de 0,511.

Apenas os resultados com a cepa industrial JP1 foram incluídos na tabela, já que todos os experimentos com a cepa A2 já foram previamente discutidos e não houve qualquer diferença significativa em relação à cepa JP1. A cepa A2 é capaz de metabolizar o amido e diversos oligômeros em solução, a partir de suas próprias enzimas α -amilase e glucoamilase, mas a ação destas enzimas não se mostrou suficiente para metabolizar os grânulos insolúveis. Já a ação enzimática do extrato foi suficiente para converter quase totalmente o amido granular em glicose.

Tabela 5.9: Respostas obtidas para as diferentes estratégias de produção de etanol. Os dados foram calculados a partir dos resultados nos tempos de fermentação de 24 h para a estratégia II e o processo com farinha de milho, e de 48 h para os demais.

Experimento	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento (Yp/s)	Produtividade (g/(L.h))	Eficiência do processo (%)
Estratégia I	1,68 ± 0,20	53,61 ± 1,07	0,42	1,12	82,98 ± 1,66
Estratégia I - Stargen™	0,99 ± 0,07	32,08 ± 1,10	0,25	0,67	49,65 ± 1,71
Estratégia II	2,13 ± 0,58	45,57 ± 3,55	0,36	1,90	70,54 ± 5,50
Estratégia III	0,66 ± 0,03	45,68 ± 0,76	0,36	0,95	70,69 ± 0,58
Milho	4,54 ± 0,27	77,98 ± 1,41	0,45	3,25	87,72 ± 0,79
SHF	1,57 ± 0,40	32,90 ± 0,67	0,26	0,69	50,92 ± 1,04 ^a
Batelada Alimentada	3,00 ± 0,17	59,15 ± 0,62	0,36	1,23	70,70 ± 0,74

^a Esta eficiência contabiliza a etapa de hidrólise realizada separadamente em condições não otimizadas

Com base nos dados apresentados anteriormente e na compilação mostrada na Tabela 5.9, pode-se verificar que, sob as mesmas condições, por meio da estratégia I, ou seja, com a realização de uma etapa de hidrólise inicial (pré-SSF) a 50 °C, o processo de SSF com o extrato enzimático apresentou uma vantagem superior ao comercial Stargen™. Ao final de 48 horas com o extrato, (82,98 ± 1,66) % do amido da farinha de babaçu foi convertido em etanol, enquanto o processo com Stargen™, que incluiu a necessidade de fonte adicional de nitrogênio e ajuste de pH, apresentou em eficiência de conversão em etanol de (49,65 ± 1,71) %. O processo de estratégia I com extrato enzimático proporcionou um rendimento $Y_p/s = 0,42$ (g etanol / g glicose), correspondendo a um desempenho 67 % superior ao obtido com o Stargen™ 002.

A estratégia I possibilitou, ainda, obter (53,61 ± 1,07) g/L de etanol e uma produtividade de 1,12 g/(L.h). Comparando-se este resultado aos dados reportados por KOPNIECZNY-JANDA *et al.* (2008), os resultados obtidos no presente trabalho são inferiores. Segundo os autores, no processo SSF de cevada (com realização de etapa de pré-SSF a 57 °C) foi obtido entre 93 e 118 g/L de etanol para o mesmo tempo de fermentação e uma produtividade final de 2,18 g/(L.h). Em termos de eficiência, foi de 95,8 % para a cevada contra 83,0 % de conversão do amido de farinha de babaçu no

presente estudo. Como o teor de amido na cevada era maior do que presente no babaçu, tem-se um potencial maior de obtenção de etanol, explicando a diferença na concentração final de etanol. Deve-se ressaltar que, além de uma temperatura de hidrólise inicial mais elevada (perto da gelatinização), foram utilizados três diferentes produtos comerciais (Stargen™, Optimash™ BG e Fermgen™), uréia como fonte de nitrogênio e ácido sulfúrico para ajuste de pH. PRANAMUDA *et al.* (1995) obtiveram eficiência de conversão de 70,5 % de etanol, a partir de sagu (*Metroxylon sagu*), enquanto RATTANACHOMSRI *et al.* (2009) reportaram uma produtividade de 0,48 g/(L.h) de etanol e eficiência de 85,4 % com o uso da polpa de mandioca. O resultado obtido na estratégia I foi similar ao alcançado por BIALAS *et al.* (2010), que na fermentação da farinha de milho obtiveram 1,32 g/(L.h) de etanol e 84,6 % de eficiência, em 72 h com Stargen™ e proteases. WANG *et al.* (2005) reportaram 86,4 % de eficiência em etanol, também sobre o milho e com adição de sulfato de amônio. Comparado a estes valores de processo SSF, os valores obtidos no presente trabalho estão na mesma faixa ou são até mesmo superiores a alguns resultados presentes nos trabalhos citados (Tabela 5.10). BARUQUE FILHO *et al.* (1998) reportaram um rendimento de 0,6 L etanol/kg amido de farinha de babaçu, com o processo convencional, o que corresponde a 82,4 % de conversão do amido em etanol. Portanto, para essa mesma matéria-prima, o presente processo, com amido de babaçu não gelatinizado, se mostrou igualmente eficiente em comparação com o processo convencional.

Tabela 5.10: Comparação do presente trabalho de produção de etanol com processos da literatura envolvendo hidrólise do amido granular e com processo convencional com farinha de babaçu.

Matérias-primas	Condições de fermentação	Enzimas e suplementos	Eficiência e/ou produtividade de Etanol	Referências
Polpa de Mandioca	T=40°C, pH=5,0 Por 48 h	Extrato de <i>A. niger</i> Ext. levedura, peptona e sais	0,48 g/(L.h) e 85,4% de eficiência de conversão	RATTANACHOMSRI <i>et al.</i> (2009)
Cevada	T=32°C, pH=3,3 por 50 h	STARGEN 001, OPTIMASHBG, 400 ppm de uréia e proteases	2,18 g/(L.h) e 95,8 % de eficiência de conversão	KOPNIECZNY- JANDA <i>et al.</i> (2008)
Milho	T=30°C, pH=4,2 por 48 h	STARGEN 001 sulfato de amônio	86,4 % de eficiência de conversão	WANG <i>et al.</i> (2005)
Farinha de Milho	T=35°C, pH=5,0 por 72 h	STARGEN 001 e protease	1,32 g/(L.h) e 84,6 % de eficiência de conversão	BIALAS <i>et al.</i> (2010)
Sagu	T=40°C, pH=3,5	Co-cultivo de <i>A. niger</i> e <i>S. cerevisiae</i>	70,5 % de eficiência de conversão	PRANAMUDA <i>et al.</i> (1995)
Milho	T=27°, pH=4,2 por 96 h	Enzimas RHS BPX™ e uréia 0,03% (m/m)	1,32 g/(L.h) chegando a 18,5 % (v/v) de etanol	LAMSAL <i>et al.</i> (2011)
Farinha de babaçu	T=30°C, pH=4,5- 4,8	Processo convencional com AMG 200 L e Termamyl 120 L	82,4 % de eficiência de conversão	BARUQUE FILHO <i>et al.</i> (1998)
Farinha de babaçu	T=32°C, pH=4,8 por 48 h	Extrato próprio de <i>A. awamori</i> Sem suplemento	1,12 g/(L.h) e 83,0 % de eficiência de conversão	PRESENTE TRABALHO

^a Processo convencional com sacarificação separada envolvendo etapas de 90 °C e 60°C

^b Termamyl 120 L (α -amilase) e AMG 200 L (glucoamilase) da Novo Nordisk

A estratégia II teve como objetivo reduzir o tempo de fermentação para assim obter uma melhor produtividade de etanol. De fato, a produtividade aumentou de 1,12 g/(L.h) para 1,90 g/(L.h). Em menos tempo de fermentação (24 h) foram produzidos (45,57 \pm 3,55) g/L de etanol. Apesar da redução no tempo de fermentação, o tempo total de processo foi maior, pois a etapa de pré-SSF foi muito maior, representando 72 horas totais de processo contra as 52 horas (4 h mais 48 h de fermentação) da estratégia I.

Comparando-se a estratégia III com a estratégia I, pode-se constatar que a realização de uma de etapa curta de pré-SSF faz diferença na resposta final. Na estratégia III a cinética do processo foi mais lenta, tendo em vista que no início da fermentação não houve carbono disponível, diferentemente do que ocorreu na estratégia I, na qual havia glicose já disponível no início da fermentação. Após 48 h

foram obtidos na estratégia III ($45,68 \pm 0,76$) g/L de etanol e uma eficiência de ($70,69 \pm 0,58$) %.

A estratégia de batelada alimentada apresentou uma produção de etanol de ($59,15 \pm 0,62$) g/L, superior em relação à estratégia I para um mesmo tempo de processo, logo sua produtividade também foi superior, com $1,23$ g/(L.h). Entretanto, houve perda na eficiência do processo. A eficiência diminuiu de ($82,98 \pm 1,66$) % para ($70,70 \pm 0,74$) %. O objetivo foi exatamente disponibilizar mais substrato para a reação (amido da farinha de babaçu) e assim aumentar o potencial de produção de etanol. Isto foi alcançado, porém observa-se que uma fração menor da farinha foi convertida em etanol, reduzindo a eficiência.

Quando comparados os processos SHF e SSF, pode-se observar que a estratégia de SHF apresentou desempenho inferior ao processo simultâneo. Ao final de 48 h de fermentação foram produzidos ($32,90 \pm 0,67$) g/L, com uma produtividade de $0,69$ g/(L.h), o que significa que o processo SSF da estratégia I apresentou produtividade de etanol 63 % superior à obtida por SHF. Outra vantagem do processo SSF sobre SHF se deve ao tempo total do processo, que foi de 52 horas contra 72 horas (24 h de sacarificação e 48 h de fermentação) do processo SHF. Com relação à eficiência do processo vale ressaltar que esta leva em conta também o quão eficiente foi a etapa de hidrólise, que neste caso foram duas etapas separadas. Por conseguinte, neste caso em que a fermentação alcoólica ocorreu separadamente, pode-se estimar a eficiência de fermentação. A Tabela 5.11 mostra esse e alguns outros parâmetros associados ao processo de SHF, além de informações sobre a condição inicial e final (48 h de fermentação).

Tabela 5.11: Desempenho do processo SHF após 48 h de fermentação.

	Experimento	SHF
Condições iniciais	Glicose inicial (g/L)	88,08
	FAN inicial (mg/L)	934,49
Respostas	FAN _{final} (mg/L)	581,90
	Biomassa (g/L)	9,02
	Etanol (g/L)	32,90
	Rendimento (Y _{x/s})	0,10
	Rendimento (Y _{p/s})	0,37
	Produtividade (g/(L.h))	0,69
	Eficiência de Fermentação (%)	73,10

Observa-se que a eficiência de fermentação foi de 73,1 % e o rendimento em etanol de 0,37. Estes parâmetros levam em conta apenas a concentração de glicose em que se iniciou a fermentação (88,1 g/L). A Tabela 5.11 apresenta, ainda, informações sobre o crescimento celular, com 9,02 g/L de massa seca de células de levedura após 48 h, obtendo-se um rendimento em células $Y_{x/s} = 0,10$ (g células/g glicose). Embora não tenha sido possível o acompanhamento do crescimento celular para os processos SSF, conforme justificado anteriormente, é provável que a levedura tenha crescido mais em SHF, ou seja, com um maior $Y_{x/s}$, e assim ter provocado um menor rendimento em etanol, como apresentado. HILL e ROBINSON (1990) obtiveram rendimento em células ($Y_{x/s}$) entre 0,06-0,1 para *S. cerevisiae* na produção de etanol, enquanto RUGGERI *et al.* (1988) estimaram valores ainda mais baixos de $Y_{x/s}$, na faixa de 0,02-0,1. O rendimento reportado no presente estudo encontra-se dentro da faixa usual para produção de etanol, porém relativamente elevado, explicando em parte o resultado pior de SHF em relação à SSF.

A eficiência do processo SSF equivale ao produto de duas eficiências: de hidrólise e de fermentação. Segundo INGLEDEW (1999), industrialmente, a eficiência de fermentação chega a 90-93%, devido principalmente ao crescimento celular e produção de outros produtos finais de metabolismo. Portanto, fazendo a consideração

que a eficiência de fermentação (relacionado à capacidade da levedura) foi de 91,5 %, um valor próximo ao máximo obtido na prática, tem-se que a eficiência de hidrólise (relacionado à capacidade das enzimas) foi de 90,7 % na estratégia I. Este valor de hidrólise é superior ao obtido no experimento sem a presença de levedura (Figura 5.28), ou seja, apenas a hidrólise do amido, que foi de 85,3 %. Desta forma, ficou demonstrado que o processo de sacarificação e fermentação simultânea apresentou taxas mais elevadas e maiores rendimentos em etanol, em comparação com SHF. Segundo WYMAN *et al.* (1992), no processo SSF, a glicose é rapidamente convertida em etanol, assim que é formada, evitando seu acúmulo no meio. Assim sendo, as leveduras não entram em contato com uma concentração muito elevada de glicose, havendo um menor estresse osmótico e uma menor inibição do processo de hidrólise em função da presença dos açúcares. WANG *et al.* (2006) reportaram que o efeito da liberação gradual simultânea ao consumo de glicose favorece a reação de hidrólise do amido, devido justamente à menor inibição pelo produto de hidrólise sobre as amilases.

Com relação ao processo de SSF com extrato enzimático para produção de etanol de milho, pode-se perceber uma produção de $(77,98 \pm 1,41)$ g/L, além das seguintes respostas: $Y_p/s = 0,45$ (g etanol/ g glicose); produtividade de 3,25 g/(L.h) de etanol; e $(87,72 \pm 0,79)$ % de eficiência do processo. LAMSAL *et al.* (2011) utilizaram elevada concentração de sólidos, com mais de 300 g/L de milho em massa seca, e obtiveram uma produtividade de 1,32 g/(L.h) e mais de 18 % (v/v) de etanol em 96 h de processo a 27 °C. WELLER *et al.* (1983) em 72 h de SSF a 32 °C converteram 89,6 % do amido de milho em etanol com uma produtividade de 0,96 g/(L.h), enquanto LEWIS *et al.* (2004) reportaram uma produtividade de 2,32 g/(L.h) e 88,9 % de eficiência do processo SSF sobre a farinha de milho a 28 °C por 65 h. Na comparação do presente processo com os valores citados, pode-se notar uma eficiência de conversão do milho em etanol um pouco abaixo dos valores reportados na literatura, porém uma maior produtividade de etanol, comprovando assim a eficiência do extrato enzimático e deste processo de produção de etanol também no caso do uso do amido granular de milho.

Com relação ao processo convencional de milho pela via seca, os dados da indústria indicam que a fermentação tem uma concentração final de 10-14% (v/v), ou seja, cerca de 80-110 g/L etanol (BOTHAST e SCHLICHER, 2005; NICHOLS *et al.*, 2008; QUINTERO *et al.*, 2008). Segundo ROEHR (2001), as produtividades são de 1,8 a 2,5 g/(L.h) para processos em batelada e cerca de 6 g/(L.h) para processos contínuos. Portanto, pode-se concluir que o presente processo, com o uso de um complexo enzimático próprio na hidrólise do amido granular, apresentou resultados de produção de etanol de milho equiparáveis com os obtidos na indústria pelo processo convencional.

Deste modo, foi demonstrado o excelente potencial de produção de etanol a partir do amido granular, com o complexo enzimático próprio produzido por FES, utilizando-se a farinha de babaçu e de milho. Embora os testes tenham sido realizados apenas com estas matérias-primas, tem-se um processo capaz de produzir etanol e possivelmente uma série de diversos outros produtos, a partir de uma ampla gama de matérias-primas amiláceas.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um processo para produção de etanol a partir de farinha de babaçu, com uso de extratos enzimáticos próprios produzidos em outro resíduo do processamento industrial do babaçu (torta), para a hidrólise granular do amido, de forma simultânea à fermentação. A fermentação no estado sólido (FES) produziu um complexo enzimático com atividade amilolítica, bem como com atividade de enzimas acessórias, capaz de hidrolisar quase totalmente o amido em sua forma granular (não gelatinizado).

Abaixo são descritas as principais conclusões obtidas durante este estudo e em seguida são discutidas sugestões para trabalhos futuros.

O fungo *Aspergillus awamori* IOC-3914 produziu elevadas quantidades de extrato enzimático com atividade amilolítica, xilanolítica, celulolítica e proteásica. Para tal, foram realizadas diversas fermentações em estado sólido (FES) utilizando a torta de babaçu como meio de cultivo, um resíduo agroindustrial e de baixo custo. Essas fermentações produziram extratos com atividades amilolíticas reproduzíveis e estáveis à estocagem na forma liofilizada por pelo menos três meses.

Os experimentos preliminares demonstraram que garantir a homogeneidade do sistema é imprescindível para uma hidrólise eficiente. O estudo das principais variáveis através de planejamento experimental mostrou uma forte influência positiva da atividade enzimática e da concentração de farinha sobre a concentração de glicose alcançada.

Níveis satisfatórios de produção de glicose (chegando a 56 g/L) foram obtidos mesmo em baixas temperaturas de hidrólise (32°C), com uma produtividade de 2,33 g/(L.h) de glicose e 43,7 % de eficiência de hidrólise. Contudo, foi desenvolvida uma nova estratégia da hidrólise do amido sem gelatinização, com uma temperatura inicial constante de 50 °C por 4 horas e em seguida uma redução na temperatura para 32 °C. Esta etapa prévia, conduzida a uma temperatura mais alta, foi denominada de pré-SSF e permitiu mais do que dobrar a taxa de produção de glicose em relação ao processo conduzido integralmente a 32 °C.

A comparação do extrato enzimático próprio com o produto comercial Stargen™ 002 demonstrou a superioridade do extrato, uma vez que, em 24 h de hidrólise, este teve eficiência de 54,95 % e o produto comercial alcançou 34,91 %, sob as mesmas condições experimentais. O extrato apresentou, ainda, taxa inicial de hidrólise de 14,64 g/(L.h), enquanto o Stargen™ 002 apresentou 9,60 g/(L.h).

Em 72 horas de hidrólise com o extrato, a concentração de glicose obtida foi de 110,9 g/L e a eficiência de hidrólise foi de 86,97 %, o que representa um rendimento de 966,4 g_{glicose}/kg_{amido}. Além da atividade amilolítica, devido à ação das enzimas proteolíticas, o extrato apresentou um rendimento de 247,9 (g_{aminoácido}/kg_{proteína}) e uma conversão de cerca de 25 % do nitrogênio das proteínas em FAN. Estes resultados tornaram evidente o excelente potencial de hidrólise do amido granular com o uso do extrato produzido pela FES.

A hidrólise com o extrato enzimático na estratégia de 50 °C por 4h iniciais e o restante a 32 °C, com concentração inicial de farinha de 190 g/L, atividade amilolítica inicial de 20 U/mL e pH=4,8, produziu um meio completo com mais de 110 g/L de glicose (fonte de carbono e energia para levedura) e 1113 mg/L de FAN (fonte de nitrogênio). Imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram que os grânulos de amido da farinha de babaçu foram progressivamente degradados até 72 h de hidrólise.

O perfil cromatográfico evidenciou mais uma importante característica do potencial de ação deste complexo enzimático sobre o amido granular, que gera como produto de hidrólise um único açúcar, a glicose.

O extrato enzimático se mostrou extremamente eficaz também sobre a farinha de milho. Ao final de 72 h de hidrólise, 182,6 g/L de glicose foram produzidos e foi obtida eficiência de hidrólise de 94,5 %. Mesmo tendo o milho como matéria-prima, o desempenho do extrato próprio foi superior ao do produto comercial Stargen™ 002.

Os estudos de fermentação alcoólica revelaram que, dentre as linhagens de leveduras recombinantes, apesar da capacidade de todas de metabolizar o amido em solução, apenas a cepa A2 (que produz α -amilase e glucoamilase) foi capaz de converter o amido solúvel em etanol. Com os ensaios com a cepa industrial,

determinou-se o tempo de propagação em 18 h de crescimento, sendo obtida uma taxa específica de crescimento (μ) de $(0,302 \pm 0,017)$ 1/h. Verificou-se, ainda, que a condição de menor disponibilidade de oxigênio foi a mais adequada para a fermentação alcoólica.

Na parte final do trabalho, foi desenvolvido um processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) para produção de etanol a partir de amido granular e diferentes estratégias de processo de SSF foram avaliadas. A partir destes estudos pode-se concluir:

- A cepa A2 não obteve vantagens significativas sobre a JP1, uma vez que a mesma não conseguiu se adaptar ao meio com somente amido granular como fonte de carbono e energia. Os valores de etanol produzidos foram muito inferiores ao encontrados nos experimentos com amido solúvel;
- A estratégia I, com uma etapa de hidrólise inicial (pré-SSF) a 50 °C por 4 h, seguida do restante do processo a 32 °C, resultou na produção de 53,6 g/L de etanol em 48 h;
- O glicerol, em todos os experimentos, foi produzido em concentrações menores do que os valores reportado na literatura. Foram consumidos aproximadamente 300 mg/L de FAN, demonstrando que a quantidade inicial de FAN presente no meio é mais do que suficiente para a fermentação alcoólica;
- O processo com a estratégia I, cepa JP1 e extrato enzimático, promoveu a conversão de $(82,98 \pm 1,66)$ % do amido da farinha de babaçu em etanol. O processo análogo com Stargen™, que incluiu a necessidade de fonte adicional de nitrogênio e ajuste de pH, apresentou em eficiência em etanol de $(49,65 \pm 1,71)$ %, evidenciando a diferença de desempenho na produção de etanol entre o extrato enzimático próprio e o preparado Stargen™ 002. Em relação à literatura, os valores obtidos foram superiores a parte dos resultados citados na literatura. Ainda, para a mesma matéria-prima, o presente processo, com amido de babaçu não gelatinizado, se mostrou igualmente eficiente em comparação com o processo convencional;

- A maior produtividade de etanol foi obtida com a estratégia II, com 1,90 g/(L.h);
- A estratégia de batelada alimentada apresentou produção de etanol ($59,15 \pm 0,62$ g/L) superior à da estratégia I, porém a eficiência do processo foi inferior ($70,70 \pm 0,74$ %);
- A produtividade em etanol do processo SSF com a estratégia I foi 63 % superior à obtida por SHF, e o tempo total de processo para SSF foi menor do que para SHF;
- Adotando a estratégia I, o extrato enzimático se mostrou extremamente eficiente na produção de etanol também a partir de amido granular de milho. Foi obtida produtividade maior de etanol dentre diversos processos citados na literatura e valores de resposta próximos aos encontrados na indústria. A produção de etanol foi de ($77,98 \pm 1,41$) g/L, $Y_p/s = 0,45$ (g etanol/ g glicose), produtividade de 3,25 g/(L.h) de etanol; e ($87,72 \pm 0,79$) % de eficiência do processo.

Portanto, a produção de etanol a partir de um resíduo agroindustrial se mostrou factível e promissora, utilizando apenas a farinha de babaçu em água, a levedura e o extrato enzimático próprio, também produzido a partir de um resíduo oriundo do processamento industrial do babaçu. O processo SSF desenvolvido mostrou dispensar a necessidade de esterilização, moagem ou peneiramento da matéria-prima, assim como de qualquer adição de fonte de nitrogênio e de ajuste de pH. Além disso, o processo desenvolvido ocorre com as etapas de sacarificação e fermentação de forma simultânea, o que se mostrou vantajoso em termos de rendimento, possivelmente vantajoso também em termos econômicos. A hidrólise do amido granular, ou o processo conhecido como *cold hydrolysis*, possibilita um processo com menor investimento capital (menos requerimento de equipamentos) e com menor demanda energética, devido à sua realização em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização do amido, o que lhe confere vantagens sob o ponto de vista econômico. Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho indicaram condições adequadas para a produção de etanol, e provavelmente adaptáveis à obtenção de

outros bioprodutos, a partir de fontes renováveis, com menores impactos ambientais e possivelmente diminuindo a dependência global que existe hoje por derivados de petróleo.

O meio de cultivo genérico desenvolvido no presente estudo possui elevados teores de fonte de carbono e nitrogênio, sendo a glicose o principal açúcar constituinte do mesmo. Esta é uma substância química fundamental para os bioprocessos e grande variedade de produtos químicos pode ser produzida a partir desta. Além do etanol, pode-se citar o ácido láctico, ácido succínico, butanol, sorbitol, ácido itacônico, aminoácidos, polihidroxialcanoatos, entre outros.

Apesar de todas as vantagens citadas, alguns problemas observados do processo como um todo foram identificados, podendo-se citar:

- Necessidade de concentração do complexo enzimático após a extração em água. Idealmente a etapa de liofilização deveria ser extinta, permitindo seguir direto da extração para a hidrólise, sem a necessidade de concentrar para atingir a atividade necessária. Assim, deve-se aumentar a produtividade da fermentação em estado sólido e/ou aprimorar-se o processo de extração das enzimas, para obtenção de um extrato com atividade amilolítica pelo menos 4 vezes mais elevada;
- Limite físico da suspensão de farinha de babaçu em água, assim limitando a quantidade de amido disponível e, portanto, limitando a quantidade máxima de etanol passível de ser obtida;
- Necessidade de aprimorar a cinética de hidrólise, uma vez que a cepa JP1 apresenta rápida capacidade de metabolização, porém a oferta de glicose é possivelmente mais lenta do que a demanda.
- Elevado teor de sólidos presentes ao final da fermentação alcoólica, o que possivelmente aumenta os custos de *downstream* do processo e dificulta o reciclo de levedura.

A identificação dos pontos fracos é extremamente importante para o desenvolvimento do processo, possibilitando melhorar e alterar alguns aspectos sobre cada um dos pontos negativos.

Assim, embora o processo desenvolvido neste trabalho tenha apresentado grande potencial de aplicação tecnológica, muito ainda precisa ser investigado e aprimorado. Desta forma, algumas sugestões para trabalhos futuros são elencadas a seguir:

- Buscar aumento da produção de enzimas amilolíticas na FES, investigando linhagens de fungos com maior capacidade de produção de amilases, bem como melhorias no processo de FES e de extração das enzimas, de modo a alcançar aumento na atividade amilolítica de ao menos 4 vezes;
- Investigar processos para aproveitamento dos resíduos sólidos provenientes da extração após a FES, possivelmente com o desenvolvimento do processo de autólise;
- Desenvolver modelos cinéticos de hidrólise do amido granular, que, devido às suas características e complexidade com diversas enzimas e diversos substratos diferentes, são pouco relatados na literatura;
- Avaliar o potencial de outras matérias-primas amiláceas além da farinha de babaçu;
- Realizar experimentos adicionais de avaliação do processo SSF, variando as condições de temperatura, pH, concentração de farinha e atividade amilolítica. Neste trabalho, estes foram baseados simplesmente nas condições desenvolvidas nos estudos prévios de hidrólise;
- Realizar experimentos de SSF para produção de etanol em biorreator instrumentado de bancada para a reprodução da melhor condição investigada, bem como otimização do processo neste sistema. Um experimento preliminar do processo (cepa JP1 e extrato enzimático sobre a farinha de babaçu) em biorreator foi realizado e consta no Apêndice D.
- Devido aos altos custos associados à etapa de propagação celular da levedura, impactando a economicidade do processo como um todo, em que se utilizou um meio (YPD) com glicose, peptona e extrato de levedura, investigar processos de propagação do inóculo com meios mais econômicos do que YPD;

- Investigar a fração residual do processo, como o “DDGS” possivelmente gerado. Similar ao processo de milho, o resíduo sólido do processo de farinha de babaçu pode apresentar uma composição de interesse alimentício, conferindo mais uma fonte de rentabilidade;
- Investigar a etapa de recuperação do etanol. Além de destilação, pode-se estudar a utilização de membranas de pervaporação, possivelmente de forma simultânea ao processo SSF;
- Desenvolver um processo com remoção de sólidos, possibilitando, assim, melhores parâmetros de resposta e alcançando maiores concentrações finais de etanol. Este processo poderia inclusive operar em modo contínuo, com sistema acoplado ao processo de separação por membrana;
- Realizar simulação do processo, bem como o desenvolver estudo de viabilidade econômica. Além disso, realizar levantamento mais aprofundado, incluindo análise de mercado, sobre toda cadeia produtiva, incluindo os problemas de logística associados à localização da principal matéria-prima (babaçu);
- Realizar uma prospecção de outros possíveis produtos de interesse, de forma a se selecionar outros produtos finais de fermentação, que potencialmente apresentem elevada produtividade e alto valor agregado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI, Y., MEDIC, J., JIANG, H., WANG, D. e JANE, J.-L. Starch Characterization and Ethanol Production of Sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, n.13, p.7385-7392. 2011.

ALFENORE, S., CAMELEYRE, X., BENBADIS, L., BIDEAUX, C., URIBELARREA, J. L., GOMA, G., MOLINA-JOUVE, C. e GUILLOUET, S. E. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.63, n.5, p.537-542. 2004.

ALMEIDA, E. D. e VIEGAS, T. Crise de oferta no mercado do etanol: conjuntural ou estrutural? *Blog Infopetro* 2011.

ALMEIDA, R. R., LACERDA, L. G., MURAKAMI, F. S., BANNACH, G., DEMIATE, I. M., SOCCOL, C. R., FILHO, M. A. D. S. C. e SCHNITZLER, E. Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis. *Thermochimica Acta*, v.519, n.1-2, p.50-54. 2011.

ALTINTAŞ, M. M., ÜLGEN, K. Ö., KIRDAR, B., ILSÉN, Ö. Z. e OLIVER, S. G. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, n.5, p.640-647. 2002.

AMORIM, H., LOPES, M., DE CASTRO OLIVEIRA, J., BUCKERIDGE, M. e GOLDMAN, G. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.91, n.5, p.1267-1275. 2011.

ANFAVEA. *Anuário da Indústria Automobilística Brasileira*. Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. 2011.

AOAC INTERNACIONAL. *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL (Supplement - 1996)* Published AOAC INTERNACIONAL. 1995.

APINAN, S., YUJIRO, I., HIDEFUMI, Y., TAKESHI, F., MYLLÄRINEN, P., FORSELL, P. e POUTANEN, K. Visual Observation of Hydrolyzed Potato Starch Granules by α -Amylase with Confocal Laser Scanning Microscopy. *Starch - Stärke*, v.59, n.11, p.543-548. 2007.

ARIFEEN, N., KOOKOS, I. K., WANG, R., KOUTINAS, A. A. e WEBB, C. Development of novel wheat biorefining: Effect of gluten extraction from wheat on bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, v.43, n.2, p.113-121. 2009.

ASHIKARI, T., NAKAMURA, N., TANAKA, Y., KIUCHI, N., SHIBANO, Y., TANAKA, T., AMACHI, T. e YOSHIZUMI, H. Rhizopus raw-starch-degrading glucoamylase: its cloning and expression in yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.50, n.4, p.957-964. 1986.

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

BAILEY, M. J., BIELY, P. e POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v.23, n.3, p.257-270. 1992.

BALAN, V., ROGERS, C., CHUNDAWAT, S., DA COSTA SOUSA, L., SLININGER, P., GUPTA, R. e DALE, B. Conversion of Extracted Oil Cake Fibers into Bioethanol Including DDGS, Canola, Sunflower, Sesame, Soy, and Peanut for Integrated Biodiesel Processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.86, n.2, p.157-165. 2009.

BALLS, A. K. e SCHWIMMER, S. Digestion of raw starch. *J. Biol. Chem*, v.156, July 17, p.203-210. 1944.

BARCELOS, C. A., MAEDA, R. N., BETANCUR, G. J. V. e PEREIRA JR, N. Ethanol production from sorghum grains [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]: evaluation of the enzymatic hydrolysis and the hydrolysate fermentability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.28, p.597-604. 2011.

BARROS, M. C., NASCIMENTO SILVA, R., RAMADA, M. H. S., GALDINO, A. S., DE MORAES, L. M. P., TORRES, F. A. G. e ULHOA, C. J. The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Carbohydrate Research*, v.344, n.13, p.1682-1686. 2009.

BARUQUE FILHO, E., BARUQUE, M., FREIRE, D. e SANT'ANNA, G. Ethanol from babassu coconut starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.70-72, n.1, p.877-886. 1998.

BARUQUE FILHO, E. A., BARUQUE, M. D. G. A. e SANT'ANNA JR., G. L. Babassu coconut starch liquefaction: an industrial scale approach to improve conversion yield. *Bioresource Technology*, v.75, n.1, p.49-55. 2000.

BASTOS, V. D. *Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias*. BNDES Setorial 2007.

BENINCA, C. *Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas*. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BERTELLI, L. G. A Verdadeira História do Proálcool. *Disponível em:* <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/historia/proalcool-historia-verdadeira.htm>>. Acesso em: Dez. 2011: O Estado de São Paulo 2007.

BHELLA, R. S. e ALTOSAAR, I. Purification and some properties of the extracellular α -amylase from *Aspergillus awamori*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.31, n.2, 2012/01/10, p.149-153. 1985.

BIALAS, W., SZYMANOWSKA, D. e GRAJEK, W. Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresource Technology*, v.101, n.9, p.3126-3131. 2010.

BLAZEK, J. e GILBERT, E. P. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. *Biomacromolecules*, v.11, n.12, p.3275-3289. 2010.

BNDES. *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável* Rio de Janeiro: BNDES. 2008. 316 p.

BOMTEMPO, J. V. O futuro dos biocombustíveis II: Por que a indústria de biocombustíveis do futuro será diferente da que conhecemos hoje? *Blog Infopetro* 2011.

BOTHAST, R. J. e SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, n.1, p.19-25. 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1-2, p.248-254. 1976.

BRASKEM. Negócios e desenvolvimento sustentável. Relatório Anual e de Sustentabilidade 2010. *Disponível em:* <http://www3.braskem.com.br/upload/rao/2010/pt/polipropileno-verde.html>: Acesso em Jan. 2012. 2010.

BRITTON, H. T. S. e ROBINSON, R. A. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society* v.130, p.1456-1462. 1931.

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V. e BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.23, n.2, p.85-112. 1998.

CARDONA, C. A. e SÁNCHEZ, Ó. J. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v.99, n.13, p.5270-5295. 2007.

CASTILHO, L. R., MEDRONHO, R. A. e ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.71, n.1, p.45-50. 2000a.

CASTILHO, L. R., POLATO, C. M. S., BARUQUE, E. A., SANT' ANNA JR., G. L. e FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v.4, n.3, p.239-247. 2000b.

CASTRO, A. M. *Aproveitamento de Co-Produtos Agroindustriais Para Produção de um Complexo Enzimático Contendo Amilases*. (Tese de Doutorado). Programa de Engenharia Química - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. 279 p.

CASTRO, A. M., CARVALHO, D. F., FREIRE, D. M. G. e CASTILHO, L. R. Economic Analysis of the Production of Amylases and Other Hydrolases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. *Enzyme Research*, v.2010. 2010a.

CASTRO, A. M., DE ANDRÉA, T. V., CARVALHO, D., TEIXEIRA, M., CASTILHO, L. R. e FREIRE, D. M. G. Valorization of Residual Agroindustrial Cakes by Fungal Production of Multienzyme Complexes and Their Use in Cold Hydrolysis of Raw Starch. *Waste and Biomass Valorization*, p.291-302. 2011.

CASTRO, A. M., DE ANDRÉA, T. V., CASTILHO, R. L. e FREIRE, D. M. G. Use of mesophilic fungal amylases produced by solid-state fermentation in the cold hydrolysis of raw babassu cake starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.162, n.6, p.1612-1625. 2010b.

CEREDA, M. P. *Propriedades Gerais do Amido*. São Paulo: Fundação Cargill, v.1 2002. 221 p. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas).

CHENG, M.-C., CHANG, R.-C., DENT, D.-F. e HSIEH, P.-C. Breeding an Amylolytic Yeast Strain for Alcoholic Beverage Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.163, n.6, p.693-706. 2011.

CLARK, J. H., BUDARIN, V., DESWARTE, F. E. I., HARDY, J. J. E., KERTON, F. M., HUNT, A. J., LUQUE, R., MACQUARRIE, D. J., MILKOWSKI, K., RODRIGUEZ, A., SAMUEL, O., TAVENER, S. J., WHITE, R. J. e WILSON, A. J. Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future. *Green Chemistry*, v.8, n.10, p.853-860. 2006.

COELHO, M. A. Z., SALGADO, A. M. e RIBEIRO, B. D. *Tecnologia Enzimática*: EPUB - Editora de Publicações Biomédicas. 2008.

COPELAND, L., BLAZEK, J., SALMAN, H. e TANG, M. C. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, v.23, n.6, p.1527-1534. 2009.

CORRADINI, E., LOTTI, C., MEDEIROS, E. S. D., CARVALHO, A. J. F., CURVELO, A. A. S. e MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.15, p.268-273. 2005.

CRA. *Telling the Positive Story of Corn*. Corn Refiners Association 2010 Annual Report. 2010.

CRABTREE, H. G. The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *The Biochemical journal*, v.22, n.5, p.1289-98. 1928.

DAMASO, M., DE CASTRO, A., CASTRO, R., ANDRADE, C. e PEREIRA, N. Application of xylanase from *thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.115, n.1, p.1003-1012. 2004.

DESER. *A CADEIA PRODUTIVA DO BABAÇU: ESTUDO EXPLORATÓRIO*. DEPARTAMENTO DE ESTUDOS SÓCIO-ECONÔMICOS – DESER. SECRETARIA DE AGRICULTURA FAMILIAR/ MDA. 2007

DUBEY, A. K., SURESH, C., KAVITHA, R., KARANTH, N. G. e UMESH-KUMAR, S. Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. *FEBS Letters*, v.471, n.2-3, p.251-255. 2000.

EPA. *Status and Impact of State MTBE Bans*. U.S. Environmental Protection Agency. Energy Information Administration. 2007

EXPASY. ProtParam tool. SIB Bioinformatics Resource Portal *Disponível em: <http://web.expasy.org/protparam/>*; Acesso em: Jan. 2012. Swiss Institute of Bioinformatics 2012.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Agricultural production domain *Disponível em: <http://faostat.fao.org/>*; Acesso em: Dez. 2011. 2011.

FARRELL, A. E., PLEVIN, R. J., TURNER, B. T., JONES, A. D., O'HARE, M. e KAMMEN, D. M. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. *Science*, v.311, n.5760, January 27, 2006, p.506-508. 2006.

FERREIRA, M. E. M. *MODELOS LOG-NORMAL E MARKOVIANO PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE ABUNDÂNCIA EM UMA FLORESTA DE BABAÇU*. (Mestrado). CENTRO TECNOLÓGICO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 1999.

FIGUEIRA, E. L. Z. e HIROOKA, E. Y. Culture medium for amylase production by toxigenic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.43, p.461-467. 2000.

FIGUEIRA, S. R. e BURNQUIST, H. L. PROGRAMAS PARA ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NOS ESTADOS UNIDOS E POSSIBILIDADES DE EXPORTAÇÃO DO BRASIL. *Agric. São Paulo*, v.53, jul./dez., p.5-18. 2006.

FREITAS, L., DA RÓS, P. C. M., SANTOS, J. C. e DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). *Process Biochemistry*, v.44, n.10, p.1068-1074. 2009.

FUJII, M., HOMMA, T. e TANIGUCHI, M. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. *Biotechnology and Bioengineering*, v.32, n.7, p.910-915. 1988.

GALVEZ, A. Analyzing cold enzyme starch hydrolysis technology in new ethanol plant design. *Ethanol Producer Magazine*, v.11, p.58-60. 2005.

GENENCOR. *Development of Improved Enzymes for the Bio-refinery*. esEGP5 Norwich, UK Genencor, a Danisco Division., 2008. p.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* , v.59, p.257-268. 1987.

GOLDEMBERG, J., COELHO, S. T., NASTARI, P. M. e LUCON, O. Ethanol learning curve — the Brazilian experience. *Biomass and Bioenergy*, v.26, n.3, p.301-304. 2004.

GOLDEMBERG, J., NIGRO, F. E. B. e COELHO, S. T. *Bioenergia no estado de São Paulo: Situação atual, perspectivas, barreiras e propostas*. : São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São. 2008. 152p. : il. p.

GOMBERT, A. K., PINTO, A. L., CASTILHO, L. R. e FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, v.35, n.1-2, p.85-90. 1999.

GOUKA, R. J., PUNT, P. J. e VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.47, n.1, p.1-11. 1997.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K. e CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v.38, n.11, p.1599-1616. 2003.

HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F., LIDÉN, G. e ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology*, v.24, n.12, p.549-556. 2006.

HELBERT, W., SCHÜLEIN, M. e HENRISSAT, B. Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* α -amylase into corn starch granules. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.19, n.3, p.165-169. 1996.

HILL, G. A. e ROBINSON, C. W. A modified ghose model for batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* at high ethanol concentrations. *The Chemical Engineering Journal*, v.44, n.3, p.B69-B80. 1990.

HÖLKER, U. e LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, v.8, n.3, p.301-306. 2005.

HOLLIDAY, G. L., ALMONACID, D. E., MITCHELL, J. B. O. e THORNTON, J. M. The Chemistry of Protein Catalysis. *Journal of Molecular Biology*, v.372, n.5, p.1261-1277. 2007.

HOLM-NIELSEN, J. B., MADSEN, M. e POPIEL, P. O. *World Bioenergy 2006 Conference on Biomass for Energy*. Jönköping, Sweden. 2006.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.45, n.3, p.253-267. 2001.

HUSTON, A. L., MARGESIN, R., SCHINNER, F., MARX, J.-C. e GERDAY, C. Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes. In: (Ed.). *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*: Springer Berlin Heidelberg, 2008. Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes, p.347-363.

IBGE. Quantidade produzida na extração vegetal por tipo de produto extrativo. *Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA*: IBGE - Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2011.

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: (Ed.). *The alcohol textbook. 3rd. ed*: UK: Nottingham University Press, 1999. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. S.P, v.1. 2005. 1018 p. (5ª edição).

IPCC. *Climate change 2007: the physical science basis*. Cambridge University Press. Cambridge. 2007.

IUBMB. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse: Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acesso em: 29 dez. 2011. 2011.

KAMM, B. e KAMM, M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, n.2, p.137-145. 2004.

KAMM, B. e KAMM, M. Biorefineries – Multi Product Processes. v.105, n.White Biotechnology, p.175-204. 2007.

KELSALL, D. R. e LYONS, T. P. Grain dry milling and cooking procedures: extracting sugars in preparation for fermentation. In: (Ed.). *THE ALCOHOL TEXTBOOK. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*: Nottingham University Press, 2003. Grain dry milling and cooking procedures: extracting sugars in preparation for fermentation.

KIM, Y., MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., EZEJI, T., BLASCHEK, H., DIEN, B., COTTA, M., DALE, B. e LADISCH, M. R. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. *Bioresource Technology*, v.99, n.12, p.5165-5176. 2008.

KOPNIECZNY-JANDA, G., LI, M., SHETTY, J. K. e TEUNISSEN, P. Production of ethanol from barley and ddgs containing reduced beta-glucan and phytic acid. US Patent, US2008/003344 2008.

KOUTINAS, A. A., WANG, R. e WEBB, C. Restructuring upstream bioprocessing: technological and economical aspects for production of a generic microbial feedstock from wheat. *Biotechnology and Bioengineering*, v.85, n.5, p.524-538. 2004.

KOUTINAS, A. A., XU, Y., WANG, R. e WEBB, C. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, n.5, p.1035-1044. 2007.

KRISHNAN, M. S., TAYLOR, F., DAVISON, B. H. e NGHIEM, N. P. Economic analysis of fuel ethanol production from corn starch using fluidized-bed bioreactors. *Bioresource Technology*, v.75, n.2, p.99-105. 2000.

KUBICEK, C. P., MESSNER, R., GRUBER, F., MACH, R. L. e KUBICEK-PRANZ, E. M. The Trichoderma cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v.15, n.2, p.90-99. 1993.

KWIATKOWSKI, J. R., MCALOON, A. J., TAYLOR, F. e JOHNSTON, D. B. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, v.23, n.3, p.288-296. 2006.

LAMSAL, B. P., WANG, H. e JOHNSON, L. A. Effect of corn preparation methods on dry-grind ethanol production by granular starch hydrolysis and partitioning of spent beer solids. *Bioresource Technology*, v.102, n.12, p.6680-6686. 2011.

LEHMANN, U. e ROBIN, F. Slowly digestible starch - its structure and health implications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v.18, n.7, p.346-355. 2007.

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

LEWIS, S. M., VANHULZEN, S. E., FINCK, J. M. e ROTH, D. L. Method for producing ethanol using raw starch. U.S. Patent Application 20040244649 2004.

LI, J., VASANTHAN, T. e BRESSLER, D. C. Improved cold starch hydrolysis with urea addition and heat treatment at subgelatinization temperature. *Carbohydrate Polymers*, v.87, n.2, p.1649-1656. 2012.

LIM, L. H., MACDONALD, D. G. e HILL, G. A. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -amylase. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.1 p.53-62. 2003.

LIMA, J. R. D. O., SILVA, R. B. D., SILVA, C. C. M. D., SANTOS, L. S. S. D., SANTOS JR, J. R. D., MOURA, E. M. e MOURA, C. V. R. D. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. *Química Nova*, v.30, p.600-603. 2007.

LOSEKANN, L. Etanol: de promessa a problema. *Blog Infopetro* 2011.

LUO, G., TALEBNIA, F., KARAKASHEV, D., XIE, L., ZHOU, Q. e ANGELIDAKI, I. Enhanced bioenergy recovery from rapeseed plant in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, v.102, n.2, p.1433-1439. 2011.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H. e PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, n.4, December 1, 2002, p.739. 2002.

MAPA. *Anuário Estatístico da Agroenergia 2010*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. 2010.

MDIC. Desenvolvimento da Produção. Biocombustíveis. Álcool combustível. *Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior*: Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=999>. Acesso em: Dez. 2011. 2011.

MENDEZ, M. H. M., DERIVI, S. C. N., RODRIGUES, M. C. R., FERNANDES, M. L. e MACHADO, R. L. D. Método de fibra detergente neutro modificado para amostras ricas em amido. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.5, n.2, p.123-131. 1985.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, 2012/01/16, p.426-428. 1959.

MORAES, L. M. P., ASTOLFI-FILHO, S. e OLIVER, S. G. Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.43, n.6, p.1067-1076. 1995.

MORRIS, V. J., GUNNING, A. P., FAULDS, C. B., WILLIAMSON, G. e SVENSSON, B. AFM Images of Complexes between Amylose and Aspergillus niger Glucoamylase Mutants, Native and Mutant Starch Binding Domains: A Model for the Action of Glucoamylase. *Starch - Stärke*, v.57, n.1, p.1-7. 2005.

MURPHY, P. Starch. In: G. O. Phillips e P. A. Williams (Ed.). *Handbook of hydrocolloids*. New York: CRC Press LLC Corporate Blvd, 2000. Starch.

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M. R., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., VICENTE, A., DOMINGUES, L. e TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, v.28, n.6, p.817-830. 2010.

NAGASAKA, Y., KUROSAWA, K., YOKOTA, A. e TOMITA, F. Purification and properties of the raw-starch-digesting glucoamylases from *Corticium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, n.3, p.323-330. 1998.

NEGI, S. e BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*, v.42, n.4, p.443-448. 2009.

NICHOLS, N. N., MONCEAUX, D. A., DIEN, B. S. e BOTHAST, R. J. Production of Ethanol from Corn and Sugarcane. In: J. W. E. Al. (Ed.). *Bioenergy*: ASM Press, Washington, DC, 2008. Production of Ethanol from Corn and Sugarcane.

NOVO, M. T., BELTRAN, G., ROZÈS, N., GUILLAMÓN, J. M. e MAS, A. Effect of nitrogen limitation and surplus upon trehalose metabolism in wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.66, n.5, p.560-566. 2005.

NREL. *Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. U.S. Department of Energy, p.76. 2004.

NREL. Glossary of Biomass Terms. *The National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy*: Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/glossary.html>. Acesso em Dez. 2011 2011.

OATES, C. G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science & Technology*, v.8, n.11, p.375-382. 1997.

ONO, K., SHINTANI, K., SHIGETA, S. e OKA, S. Comparative studies of various molecular species in *Aspergillus niger* glucoamylase. *Agricultural and Biological Chemistry* v.57, n.7, p.1699-1706. 1988.

PAES, M. C. D. *Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho*. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 75). Sete Lagoas, MG: Dezembro, p.6. 2006

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v.27, n.2, p.109-117. 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2-3, p.81-84. 2003.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C. R., SOCCOL, V. T., SINGH, D. e MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry* v.31, n.2,, p.135-152. 2000a.

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

PAVLAK, M. C. D. M., ZUNIGA, A. D., LIMA, T. L. A., ARÉVALO-PINEDO, A., CARREIRO, S. C., FLEURY, C. S. e SILVA, D. L. Aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu (*Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. *Evidência - Biotecnologia e Alimentos*, v.7, n.1. 2007.

PEARL, R. The growth of populations. *Quart. Rev. Biol.* , v.2, p.532-548. 1927.

PEREIRA, E. M. O OURO NEGRO. Petróleo e suas crises políticas, econômicas, sociais e ambientais na 2ª metade do século XX. *Outros Tempos*, v.5, n.Dossiê Religião e Religiosidade, p.54 -72. 2008.

PERKIS, D., TYNER, W. e DALE, R. Economic analysis of a modified dry grind ethanol process with recycle of pretreated and enzymatically hydrolyzed distillers' grains. *Bioresource Technology*, v.99, n.12, p.5243-5249. 2008.

PICKENS, C. E., NIEKAMP, C. W. Process for the enzymatic hydrolysis of non-gelatinized granular starch material directly to glucose I. Decatur: A. E. Staley Manufacturing Company U.S. Patent 4,612,284 1986.

PIMENTEL, D. e PATZEK, T. W. Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research*, v.14, n.1, p.65-76. 2005.

PLANCHOT, V., ROGER, P. e COLONNA, P. Suitability of Starch Granule Porosity for Biosynthesis and Amylolysis Susceptibility. *Starch - Stärke*, v.52, n.10, p.333-339. 2000.

POWER, R. F. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. In: (Ed.). *THE ALCOHOL TEXTBOOK. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*: UK: Nottingham University Press, 2003. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars.

PRAKASH, O. e JAISWAL, N. α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.160, n.8, p.2401-2414. 2010.

PRANAMUDA, H., LEE, S.-W., OZAWA, T. e TANAKA, H. Ethanol Production From Raw Sago Starch Under Unsterile Condition. *Starch - Stärke*, v.47, n.7, p.277-280. 1995.

QUINTERO, J. A., MONTOYA, M. I., SÂNCHEZ, O. J., GIRALDO, O. H. e CARDONA, C. A. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. *Energy*, v.33, n.3, p.385-399. 2008.

RAGAUSKAS, A. J., WILLIAMS, C. K., DAVISON, B. H., BRITOVSEK, G., CAIRNEY, J., ECKERT, C. A., FREDERICK JR, W. J., HALLETT, J. P., LEAK, D. J., LIOTTA, C. L., MIELENZ, J. R., MURPHY, R., TEMPLER, R. e TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, v.311, n.5760, p.484-489. 2006.

RAGHAVARAO, K. S. M. S., RANGANATHAN, T. V. e KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2-3, p.127-135. 2003.

RAMACHANDRAN, S., PATEL, A. K., NAMPOOTHIRI, K. M., CHANDRAN, S., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R. e PANDEY, A. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, p.309-317. 2004.

RATTANACHOMSRI, U., TANAPONGPIPAT, S., EURWILAICHITR, L. e CHAMPREDA, V. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis* (DOI:10.1016/j.jbiosc.2008.12.024). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.108, n.4, p.357. 2009.

RFA. Ethanol Industry Outlook 2010. Climate of Opportunity. (Renewable Fuels Association): Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics>. Acesso em Dez. 2011. 2010.

RFA. Biorefinery Locations. (Renewable Fuels Association). Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/bio-refinery-locations/>. Acesso em: Dez 2011. 2011.

RIAZ, M., PERVEEN, R., JAVED, M. R., NADEEM, H. e RASHID, M. H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v.41, n.5, p.558-564. 2007.

ROBERTSON, G. H., WONG, D. W. S., LEE, C. C., WAGSCHAL, K., SMITH, M. R. e ORTS, W. J. Native or raw starch digestion: A key step in energy efficient biorefining of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.2, p.353-365. 2006.

ROCHA, T., CARNEIRO, A. P. e FRANCO, C. M. Effect of enzymatic hydrolysis on some physicochemical properties of root and tuber granular starches. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.2, p.544-551. 2010.

ROEHR, M. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*: WILEY-VCH Verlag GmbH. 2001.

RUEGGER, M. J. S. e TAUKE-TORNISIELO, S. M. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, p.205-211. 2004.

RUGGERI, B., SPECCHIA, V., SASSI, G. e GIANETTO, A. Numerical estimation of biokinetic parameters. *The Chemical Engineering Journal*, v.39, n.2, p.B17-B24. 1988.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: (Ed.). *THE ALCOHOL TEXTBOOK. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*: UK: Nottingham University Press, 2003. Understanding yeast fundamentals.

SAMUEL, D. Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. *Science*, v.273, n.5274, July 26, 1996, p.488-490. 1996.

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

SANTOS, M. M., ROSA, A. S., DAL'BOIT, S., MITCHELL, D. A. e KRIEGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresource Technology*, v.93, n.3, p.261-268. 2004.

SARIKAYA, E., HIGASA, T., ADACHI, M. e MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, v.35, n.7, p.711-715. 2000.

SAUER, J., SIGURSKJOLD, B. W., CHRISTENSEN, U., FRANDBSEN, T. P., MIRGORODSKAYA, E., HARRISON, M., ROEPSTORFF, P. e SVENSSON, B. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v.1543, n.2, p.275-293. 2000.

SCHILL, S. R. Embracing the Carbohydrate Economy. *Ethanol Producer Magazine* 2008.

SECEX. Desenvolvimento da Produção. Biocombustíveis. Álcool combustível. Estatísticas e anexos. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=999>; Acesso em: Dez. 2011. 2011.

SHARIFFA, Y. N., KARIM, A. A., FAZILAH, A. e ZAI DUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids*, v.23, n.2, p.434-440. 2009.

SHIGECHI, H., KOH, J., FUJITA, Y., MATSUMOTO, T., BITO, Y., UEDA, M., SATOH, E., FUKUDA, H. e KONDO, A. Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.8, August 1, 2004, p.5037-5040. 2004.

SILVA-FILHO, E. A., DE MELO, H., ANTUNES, D., SANTOS, S., RESENDE, A., SIMÕES, D. e DE MORAIS JR, M. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.32, n.10, p.481-486. 2005.

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

SOLOMON, B. D., BARNES, J. R. e HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy*, v.31, n.6, p.416-425. 2007.

SORDA, G., BANSE, M. e KEMFERT, C. An overview of biofuel policies across the world. *Energy Policy*, v.38, n.11, p.6977-6988. 2010.

SPIER, M. R. *PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS FÚNGICAS α -AMILASE e AMILOGLUCOSIDASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO*. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SRICHUWONG, S., GUTESA, J., BLANCO, M., DUVICK, S. A., GARDNER, C. e JANE, J.-L. Characterization of Corn Grains for Dry-Grind Ethanol Production. *Journal of ASTM International*, v.7, n.2. 2010.

SUGANUMA, T., FUJITA, K. e KITAHARA, K. Some Distinguishable Properties between Acid-Stable and Neutral Types of α -Amylases from Acid-Producing Koji. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.104, n.5, p.353-362. 2007.

SUMNER, J. B. DINITROSALICYLIC ACID: A REAGENT FOR THE ESTIMATION OF SUGAR IN NORMAL AND DIABETIC URINE. *Journal of Biological Chemistry*, v.47, n.1, June 1, 1921, p.5-9. 1921.

SUN, Z. e HENSON, C. A. Degradation of Native Starch Granules by Barley alpha-Glucosidases. *Plant Physiology* v.94, p.320-327. 1990.

SZKLO, A. BIOCMBUSTÍVEIS PERSPECTIVAS E EXPECTATIVAS MUNDIAIS DIANTE DO ETANOL AUTOMOTIVO. *Revista POLÊMICA* nº 3 2007.

TATSUMI, H. e KATANO, H. Kinetics of the Surface Hydrolysis of Raw Starch by Glucoamylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.21, 2012/01/03, p.8123-8127. 2005.

TAYLOR, M. P., ELEY, K. L., MARTIN, S., TUFFIN, M. I., BURTON, S. G. e COWAN, D. A. Thermophilic ethanologenesi: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in biotechnology*, v.27, n.7, p.398-405. 2009.

TEIXEIRA, M. A. Biomassa de babaçu no Brasil. In: *ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL*, v.4. 2002.

TEIXEIRA, M. A. Babassu — A new approach for an ancient Brazilian biomass. *Biomass and Bioenergy*, v.32, n.9, p.857-864. 2008.

TESTER, R. F. e KARKALAS, J. The Effects of Environmental Conditions on the Structural Features and Physico-chemical Properties of Starches. *Starch - Stärke*, v.53, n.10, p.513-519. 2001.

TESTER, R. F., QI, X. e KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, v.130, n.1-2, p.39-54. 2006.

TEXTOR, S. D., HILL, G. A., MACDONALD, D. G. e DENIS, E. S. Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v.76, n.1, p.87-93. 1998.

UEDA, M., ASANO, T., NAKAZAWA, M., MIYATAKE, K. e INOUE, K. Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v.150, n.1, p.125-130. 2008.

UEDA, S. Fungal glucoamylases and raw starch digestion. *Trends in Biochemical Sciences*, v.6, n.0, p.89-90. 1981.

UNEP. *Towards sustainable production and use of resources: Assessing Biofuels*: United Nations Environment Programme. 2009. 120 p.

UNICA. Produção de etanol do Brasil. *Disponível em:*
<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>: Acesso em Dez. 2011. 2011.

USDA. *China - Peoples Republic of. Biofuels Annual. 2011. Annual Report.* 2011

UTHUMPORN, U., ZAIDUL, I. S. M. e KARIM, A. A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, v.88, n.1, p.47-54. 2009.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H. e DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, v.94, n.2, p.137-155. 2002.

VAN DIJKEN, J. P. e SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, v.32, n.3-4, p.199-224. 1986.

VIDAL, B. C., RAUSCH, K. D., TUMBLESÓN, M. E. e SINGH, V. Kinetics of granular starch hydrolysis in corn dry-grind process. *Starch/Staerke*, v.61, n.8, p.448-456. 2009a.

VIDAL, B. C., RAUSCH, K. D., TUMBLESÓN, M. E. e SINGH, V.. Protease Treatment to Improve Ethanol Fermentation in Modified Dry Grind Corn Processes. *Cereal Chemistry Journal*, v.86, n.3, 2012/01/05, p.323-328. 2009b.

VINIEGRA-GONZALEZ, G., FAVELA-TORRES, E., AGUILAR, C. N., ROMERO-GOMEZ, S. D. J., DAZ-GODNEZ, G. e AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2, p.157-167. 2003.

WANG, J.-P., ZENG, A.-W., LIU, Z. e YUAN, X.-G. Kinetics of glucoamylase hydrolysis of corn starch. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.81, n.4, p.727-729. 2006.

WANG, P., JOHNSTON, D. B., RAUSCH, K. D., SCHMIDT, S. J., TUMBLESÓN, M. E. e SINGH, V. Effects of protease and urea on a granular starch hydrolyzing process for corn ethanol production. *Cereal Chemistry*, v.86, n.3, p.319-322. 2009a.

WANG, P., LIU, W., JOHNSTON, D. B., RAUSCH, K. D., SCHMIDT, S. J., TUMBLESÓN, M. E. e SINGH, V. Effect of Endosperm Hardness on an Ethanol Process Using a Granular Starch Hydrolyzing Enzyme. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, v.53(1): , p.307-312. 2010a.

WANG, P., SINGH, V., XU, L., JOHNSTON, D. B., RAUSCH, K. D. e TUMBLESÓN, M. E. Comparison of enzymatic (E-Mill) and conventional dry-grind corn processes using a granular starch hydrolyzing enzyme. *Cereal Chemistry*, v.82, n.6, p.734-738. 2005.

WANG, P., SINGH, V., XUE, H., JOHNSTON, D. B., RAUSCH, K. D. e TUMBLESÓN, M. E. Comparison of raw starch hydrolyzing enzyme with conventional liquefaction and saccharification enzymes in dry-grind corn processing. *Cereal Chemistry*, v.84, n.1, p.10-14. 2007.

WANG, R., GODOY, L. C., SHAARANI, S. M., MELIKOGLU, M., KOUTINAS, A. e WEBB, C. Improving wheat flour hydrolysis by an enzyme mixture from solid state fungal fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.44, n.4, p.223-228. 2009b.

WANG, R., SHAARANI, S. M., GODOY, L. C., MELIKOGLU, M., VERGARA, C. S., KOUTINAS, A. e WEBB, C. Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. *Enzyme and Microbial Technology*, v.47, n.3, p.77-83. 2010b.

WELLER, C. L., STEINBERG, M. P. e RODDA, E. D. *Fuel ethanol from raw corn by Aspergilli hydrolysis with concurrent yeast fermentation*. 1983. Medium: X; Size: Pages: 437-447 p.

WORLD WATCH INSTITUTE. *State of the World 2006 Report*. World watch Institute 2006

WYMAN, C. E., SPINDLER, D. D. e GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v.3, n.5, p.301-307. 1992.

XU, Y., WANG, R. H., KOUTINAS, A. A. e WEBB, C. Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, v.45, n.2, p.153-163. 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A

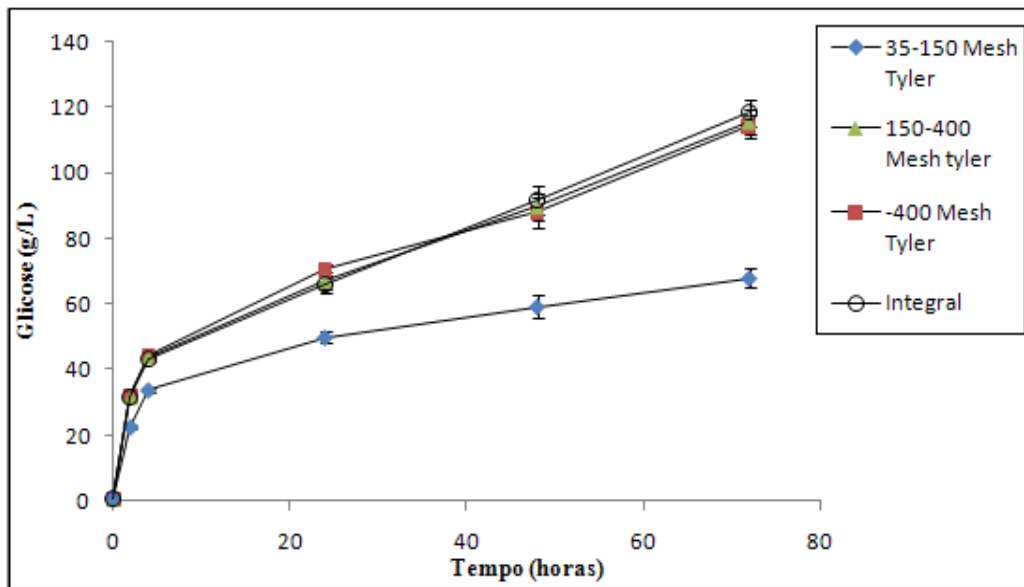


Figura A. 1: Perfis de hidrólise da farinha de babaçu em diferentes granulometrias. Farinha bruta (integral); menor do que 400 mesh; entre 150 e 400 mesh; e entre 35 e 150 mesh.

A Figura A.1 mostra que não houve vantagens de alguma faixa granulométrica sobre a farinha bruta, sem qualquer peneiramento.

APÊNDICE B

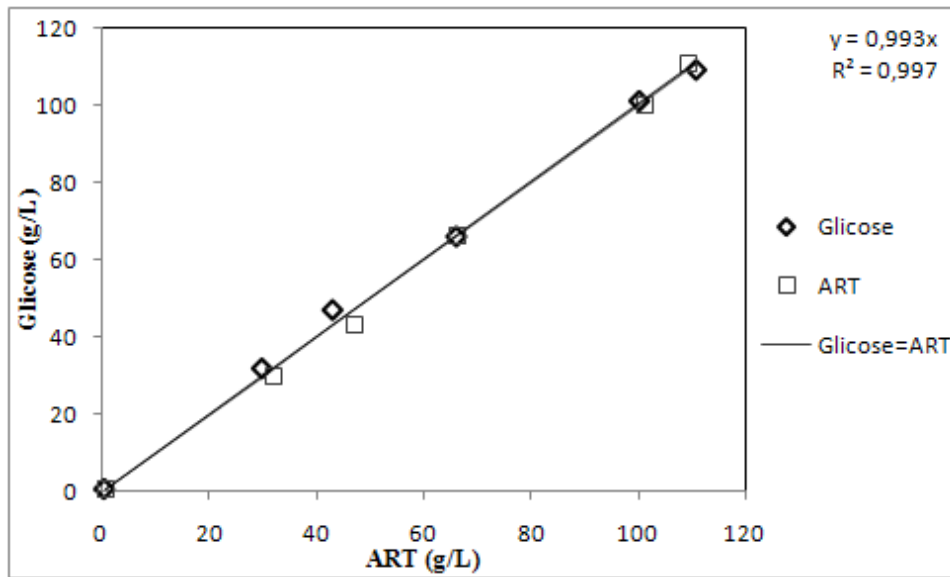


Figura A. 2: Correlação entre a concentração de açúcar redutores obtidos por DNS (ART) e glicose por kit enzimático. A linha sólida representa $ART = Glicose$.

A Figura A.2 mostra boa concordância ($ART/Glicose = 1,007$, $r = 0,997$) entre os dois métodos analíticos utilizando as concentrações de glicose. Este fato se deve, a glicose ser o produto dominante nas amostras hidrolisadas.

APÊNDICE C

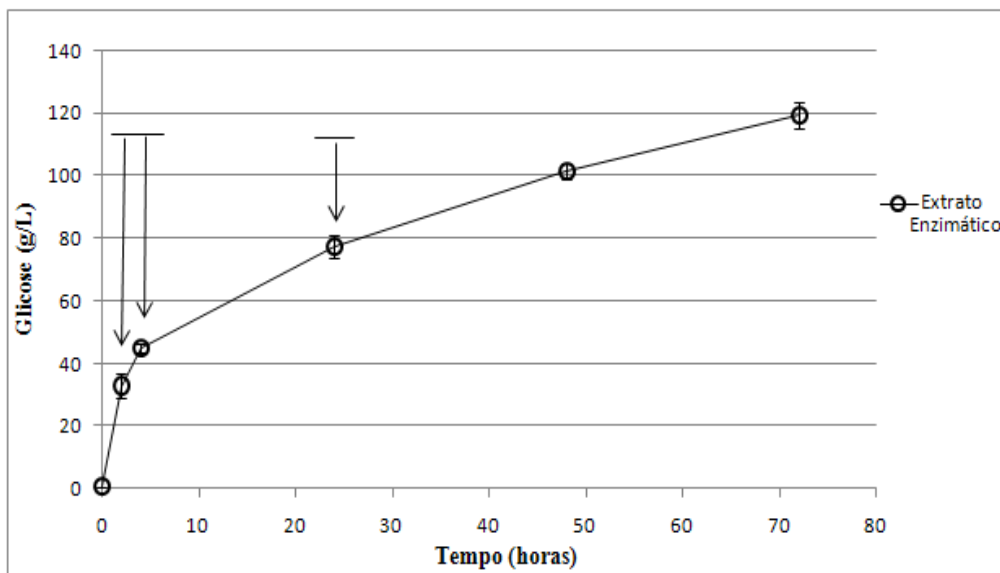


Figura A. 3: Teste de hidrólise com extrato enzimático na batelada alimentada de farinha de babaçu. As setas indicam o tempo das 3 alimentações de farinha com 10 % em cada (em relação à massa inicial).

APÊNDICE D

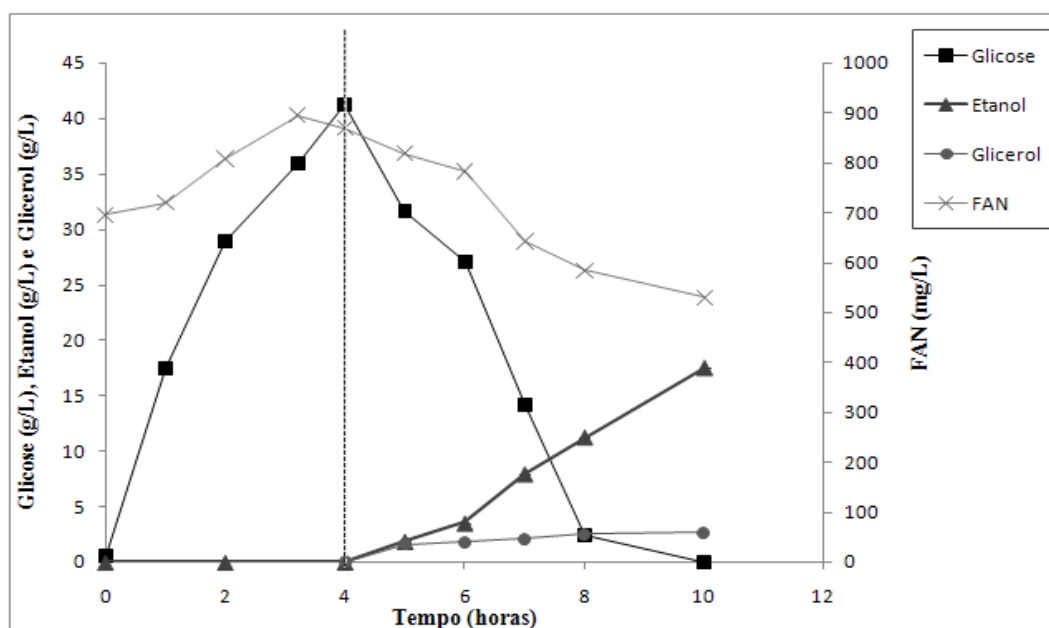


Figura A. 4: Experimento de SSF em biorreator instrumentado com extrato enzimático e em batelada alimentada de farinha de babaçu. Foram realizadas 3 alimentações de farinha com 10 % em cada (em relação à massa inicial) nos tempos de 1, 2 e 4 h. A linha pontilhada indica mudança na temperatura de 50 °C para 32 °C.

A Figura A.4 mostra o experimento do processo de SSF para produção de etanol a partir da farinha de babaçu. Foi utilizada uma estratégia híbrida entre a estratégia I, II e IV. As condições iniciais foram: concentração de 190 g/L farinha de babaçu; atividade amilolítica inicial de 20 U/mL; e pH=4,8. Foi adotada a estratégia de 50 °C por 4 h iniciais (pré-SSF) e o restante a 32 °C, com adições de farinha (10 % em relação à massa inicial) nos tempos de 1 h, 2 h e 4 h. Foi ainda utilizado um inóculo mais elevado de levedura, com 2,5 g/L de células (massa seca). A linha pontilhado do gráfico indica o momento de mudança na temperatura, inoculação com levedura e início de SSF. O processo foi conduzido em biorreator com aproximadamente 400 rpm de agitação (variou entre 300 e 600 rpm) e oxigênio dissolvido controlado em 10 % da saturação, com um fluxo de ar entre 2,5 e 5,0 L/min. Os pontos experimentais se referem apenas até 10 h de processo (6 h de SSF). Os pontos referentes ao dia seguinte (21, 24, 27 e 30 h) apresentavam valores nulos de etanol. Indicando algum problema operacional ou condição de aeração não favorável (levando ao crescimento celular em demasia e fase de diauxia consumindo o etanol produzido anteriormente).