

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

LANNA LÔBO DE ARAÚJO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES
RECOMBINANTES PARA HIDRÓLISE DE AMIDO DE
MANDIOCA VISANDO PRODUÇÃO DE ETANOL**

**MANAUS
2021**

LANNA LÔBO DE ARAÚJO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES
RECOMBINANTES PARA HIDRÓLISE DE AMIDO DE
MANDIOCA VISANDO PRODUÇÃO DE ETANOL**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

ORIENTADOR: DR. SPARTACO ASTOLFI FILHO

CO-ORIENTADOR: DR. EDSON JUNIOR DO CARMO

**MANAUS
2021**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A663o Araújo, Lanna Lôbo de
Otimização da produção de amilases recombinantes para
hidrólise de fontes amiláceas visando produção de álcool de amido
/ Lanna Lôbo de Araújo . 2021
126 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Coorientador: Edson Júnior do Carmo
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Etanol. 2. Biomassas. 3. Amilases recombinantes. 4.
Fermentação. I. Astolfi Filho, Spartaco. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

LANNA LÔBO DE ARAÚJO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES
RECOMBINANTES PARA HIDRÓLISE DE AMIDO DE
MANDIOCA VISANDO PRODUÇÃO DE ETANOL**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovado em vinte e quatro de março de dois mil e vinte um.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho,
Presidente Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. André Luís Willerding,
Membro Centro de Biotecnologia do Amazonas – CBA

Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque,
Membro Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Profa. Dra. Priscila Pauly Ribas,
Membro Samsung Research & Development Institut Brazil

Profa. Dra. Leiliane do Socorro Sodré de Souza,
Membro Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Aos meus pais, Dalvino e Valcy (*in memoriam*), pela educação que recebi, pela dedicação, carinho e amor;

Aos meus irmãos Indramara, Márcio e Dalvino Jr;

Aos meus Cunhados Nilda, Willis e Kamila;

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

Pelo carinho e apoio incondicional em TODAS as minhas conquistas.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho contei com a ajuda de pessoas especiais, às quais lhes tenho grande gratidão.

Aos meus orientadores Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dr. Edson Júnior do Carmo, pelo voto de confiança, incentivo e oportunidade de trabalhar na área de bioprocessos e biotecnologia industrial, agradeço também pela atenção, as discussões e contribuições científicas e o auxílio na correção dos trabalhos e de mais esta realização. Pela humildade, humanidade e sensibilidade de voltarem seus olhares não somente para a parte acadêmica, mas também pela parte humana e necessidades extremas que nos são apresentadas a cada instante. Meu muito, muito, muito obrigada!

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

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

Ao Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Engenharia Química/FT-UFAM e ao Técnico Samuel de Souza Feitoza pelo apoio e acompanhamento nos experimentos sempre com muito carinho e atenção.

A Central de Análises Químicas – CAQ/UEA na pessoa do Professor Dr. Sergio Duvoisin Junior pelo auxílio com a realização da análise em Cromatografia Gasosa do álcool produzido, que foi de grande importância para o término desta tese.

Aos colegas de trabalho do DEQ/FT/UFAM, Ângela Costella, Arley Rossi, Cristiane Daliassi, Franz Berbert, Nazareno Braga, Ocilde Custódio, Willian Silva e Yanne Gurgel, pela solicitude, apoio e compreensão na fase de conclusão deste trabalho.

Aos meus alunos, pupilos, jovens mancebos, em nome do Marcos Rúberon, agradeço.

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

Ao Paulo Abraão pela companhia e ajuda rotineira do laboratório, pelas retiradas de meios da autoclave tarde da noite para quando chegasse cedo no outro dia estarem em condições de seguir as bateladas... E bote batelada nisso, foram muitas!!!

Ao Júlio pelo zelo aos equipamentos dos laboratórios...

A Carmem Lúcia nos preparos de litros e mais litros de tampões, sempre falando, eu faço, mas tu já fizeste os cálculos??? Tudo para não ter que ajustar o pH... Mas com regentes novíssimos já viu... E dá-lhe ajustes!!! O importante sempre dava tudo certo no final.

A Elza que sempre com muito carinho e disponibilidade me ajudava com milhares de *erlens*, fantasmilhas coloridos e tubos falcons... “Lá vem a Lanna Lôbo com esse monte de material”, mas bastava uma carinha de tristeza pidona e ela se derretia toda!!! Até descascava meus tucumãs!!!

Aos amigos de labuta madrugadas a dentro, pela especial ajuda na parte experimental, pelo bom humor incontestável e por tornar o laboratório um ambiente alegre e descontraído. Que muitas vezes me salvaram em momentos de extrema necessidade quando precisava me ausentar de forma brusca das atividades por motivos muitas vezes de vida ou morte, literalmente. O povo do café (o meu sempre com leite) ou simplesmente do grupo do OOOOOO – Anita, Cida, Pamella, Samanta, Hayssa, Jessica, Suellen – Alana, André, Jander, Minerval. Obrigada pela amizade, companheirismo e orações.

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

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

A minha mãe, Valcy (*in memoriam*), em especial, que fiquei sem sua presença neste plano durante o decorrer desse trabalho. Porém, nunca me deixou sozinha em nenhum momento, sua presença sempre esteve viva e companheira como sempre fomos uma da outra. Que diga o querido amigo Rogério Oliveira quando ela se fazia manifestar deixando exalar seu cheiro agradável de flores avisando – FILHA, EU ESTOU AQUI!!!

Aos meus irmãos Indramara, Márcio e Dalvino Jr; cunhados Nilda, Willis e Kamila; sobrinhos Matheus, Indra, Maria Luiza, Marina e João pelo apoio e carinho, principalmente durante a realização dos experimentos que precisei estar tão ausente.

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

A UFAM pela oportunidade de capacitação.

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

Em 5-4-015

Queridos filhos, gen-
ro nora e netos.

Um beijo, abraços
a todos pela passagem
da Páscoa. Que Deus
nos abençoe e nos
proteja sempre.
Valeu da mãe
amiga.

Valeu

Um beijo para cada
um.

RESUMO

Nos últimos 30 anos, os processos industriais de fermentação alcoólica aumentaram, significativamente, a rentabilidade global das destilarias brasileiras de 75-80% para 90-92% e reduziram os custos de produção. Vários fatores contribuíram para a melhoria dos processos industriais, incluindo a identificação, monitoramento e seleção de linhagens de leveduras. Materiais amiláceos representam uma fonte muito importante e promissora de biomassa renovável. Para transformá-los em açúcares fermentáveis, a degradação do mesmo depende da ação das enzimas que realizam a bioconversão desse material e é um dos principais fatores que devem ser considerados. A estratégia adotada para desenvolver esse trabalho foi a otimização dos meios de cultura para a produção das amilases recombinantes através da metodologia de superfície de resposta (RSM) baseada no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que foi usada também para otimizar os sólidos e as cargas enzimáticas para aumentar a liberação de glicose e o rendimento da hidrólise enzimática; concentração por sistema de ultrafiltração tangencial em membranas; avaliação da hidrólise através das fermentações e análise do produto final por cromatografia gasosa (CG). Neste contexto, o estudo em questão teve como objetivo otimizar a produção de amilases recombinantes para hidrólise de fontes amiláceas visando produção de álcool de amido. O hidrolisado da fécula de mandioca *Manihot esculenta* Crantz, fonte amilácea utilizada, foi obtido com a utilização de amilases recombinantes, sendo uma α -amilase clonada de *Bacillus licheniformis* e uma glicoamilase clonada de *Aspergillus awamori* ambas expressas em *Pichia pastoris* GS115, advindas de trabalhos anteriormente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. O hidrolisado obtido foi fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial em sistemas conhecidos como fermentômetros (*airlock*). As cargas ótimas de sólidos e carga de mistura enzimática estabelecidas com RSM foram de 458,1 g/L e 19,15 μ L/g de amido de fécula, respectivamente, e nessas condições (330 ± 4) g/L de glicose foram obtidos, correspondendo a um rendimento de hidrólise de 89,36%. O hidrolisado resultou em uma concentração de 64,62 g/L de etanol correspondendo 86% de conversão em 10 h de fermentação, com eficiência de hidrólise fermentativa (HF) igual a 86,16%, produtividade volumétrica (Q_P) 6,46 g/Lh e fator de rendimento em substrato consumido ($Y_{P/S}$) de 0,431 g/g.

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

ABSTRACT

Over the last 30 years, the industrial alcoholic fermentation processes have, significantly, increased the global profitability of Brazilian distilleries from 75-80% to 90-92% and reduced its production costs. Several factors contributed to the industrial processes improvement, including the identification, monitoring and the selection of yeast lineages. Starchy materials represent a very important and promising source of renewable biomass. To transform them into fermentable sugars, their degradation depends on the action of enzymes that can make the bioconversion of this material and it's one of the main factors to be considered. The adopted strategy to develop this work was the culture medium optimization to the production of recombinant amylases through the Response Surface Methodology (RSM) based on the Rotational Central Composite Design (RCCD) which was also used to optimize the solids and the enzymatic loads to increase the glucoses releases and the enzymatic hydrolysis yield; concentration by tangential ultrafiltration in membranes; evaluation of the hydrolysis through the fermentation and analysis of the final product by gas chromatography. In this context, the present study aimed to optimize a production of recombinant amylases for hydrolysis of starchy resources aiming the starch alcohol production. The hydrolyzate of the cassava starch *Manihot esculenta* Crantz, the used starch source, have been obtained by the recombinant amylases utilization, being a cloned α -amylase from *Bacillus licheniformis* and a cloned glucoamylase from *Aspergillus awamori* both expressed in *Pichia pastoris* GS115, derived from previous works of our research team. The obtained hydrolyzate was fermented by a commercial *Saccharomyces cerevisiae* inside commercial systems named fermentometers. The optimal solid loads and enzyme blend loads set by RSM was 458,1 g/L and 19,15 μ L/g of starch, respectively, and by these conditions was obtained (330 ± 4) g/L of glucose, corresponding to a hydrolysis yield of 89,36%. The hydrolyzate resulted in a concentration of 64,62 g/L of ethanol corresponding to 86% of conversion in 10h fermentation, with the fermentative hydrolysis (FH) at 86,16%, volumetric productivity (Q_p) 6,46 g/Lh and a yield factor in consumed substrate ($Y_{P/S}$) of 0,431g/g.

Keywords: Ethanol; biomass; recombinant amylases; fermentation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	O amido.....	21
2.1.1	Amilose.....	22
2.1.2	Amilopectina.....	24
2.2	Fécula de mandioca (<i>Manihot esculenta Crantz</i>).....	25
2.2.1	A mandioca e sua agroindustrialização.....	27
2.2.2	A mandioca e a produção de bioetanol.....	28
2.3	Enzimas amilolíticas ou modificadoras de amido.....	33
2.3.1	As α -amilases.....	33
2.3.2	Glicoamilases.....	35
2.3.3	α -amilase recombinante utilizada neste trabalho.....	38
2.3.4	Glicoamilase recombinante utilizada neste trabalho.....	39
2.4	Mercado global de enzimas.....	40
2.5	Os meios de Cultivo.....	42
2.6	Hidrólise enzimática do amido.....	43
2.7	Fermentação alcoólica.....	45
2.8	Produção de etanol no Brasil.....	47
2.8.1	Uso e produção de etanol no Brasil.....	47
2.8.2	Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL).....	48
2.8.3	Programa RenovaBio.....	50
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivo Geral.....	52
3.2	Objetivos Específicos.....	52
4	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	Otimização do meio de cultivo para produção das amilases recombinantes.....	53
4.1.1	Microrganismos.....	53
4.1.2	Meios de manutenção e cultivos da levedura <i>P. pastoris</i>	54
4.1.3	Otimização do meio de cultivo.....	56
4.1.3.1	Otimização da produção da glicoamilase.....	57
4.1.3.2	Otimização da produção da α -amilase.....	58
4.1.4	Dosagens amilolíticas.....	60
4.1.4.1	Atividade dextrinizante da α -amilase.....	60
4.1.4.2	Atividade amiloglicosidásica.....	61
4.2	Produção das amilases em frascos agitados em meio de cultura otimizado,.....	61
4.3	Concentração o caldo enzimático.....	62
4.3.1	Concentração por ultrafiltração tangencial em sistema de membranas de fibras ocas.....	62
4.4	Avaliação da estabilidade das enzimas aplicadas no processo de liquefação, sacarificação.....	65
4.4.1	Quantificação do Teor de Amido na Fécula de Mandioca.....	65
4.4.2	Estudo da Hidrólise Enzimática.....	66
4.4.2.1	Estudo das cargas enzimáticas na hidrólise do amido da Fécula de Mandioca.....	66
4.4.2.2	Quantificação de glicose pelo método glicose oxidase (GOD).....	68
4.4.2.3	Estudo da otimização da proporção sólido:líquido para hidrólise do amido da Fécula de Mandioca pela mistura enzimática otimizada.....	68
4.4.3	Hidrólise de Fécula de Mandioca.....	70

4.5	Avaliação da utilização do caldo enzimático concentrado na hidrólise de amido de mandioca.....	70
4.5.1	Meio de fermentação da levedura <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	70
4.5.2	Fermentação submersa do hidrolisado de fécula de mandioca pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em fermentômetros (<i>airlock</i>).....	71
4.6	Determinação do Teor de Etanol.....	73
4.6.1	Análise do álcool.....	73
4.7	Avaliação da estabilidade das enzimas concentradas.....	74
5	RESULTADOS	75
5.1	Otimização do meio de cultivo para produção das amilases recombinantes.....	75
5.1.1	Otimização da produção da glicoamilase.....	75
5.1.2	Otimização da produção da α -amilase.....	84
5.2	Produção e concentração por ultrafiltração tangencial do caldo enzimático.....	95
5.3	Avaliação da estabilidade das enzimas concentradas.....	95
5.4	Avaliação da utilização do complexo enzimático concentrado na hidrólise de amido de mandioca.....	96
5.4.1	Quantificação do Teor de Amido na Fécula de Mandioca.....	96
5.4.2	Estudo da Hidrólise Enzimática.....	96
5.4.2.1	Estudo das cargas enzimáticas na hidrólise do amido da fécula de mandioca	96
5.4.2.2	Estudo da otimização da proporção sólido:líquido para hidrólise do amido de fécula de mandioca pela carga enzimática otimizada.....	99
5.5	Hidrólise de Fécula de Mandioca.....	108
5.6	Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado em fermentômetros para obtenção de álcool utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
5.7	Determinação do Teor de Etanol.....	110
6	CONCLUSÕES	112
7	SUGESTÕES	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO 1	124

LISTA DE FIGURAS

1	Esquema da Estrutura Química do Amido mostrando as unidades monoméricas de glicose – adaptado.....	21
2	Esquema da estrutura química e helicoidal da molécula de amilose.....	23
3	Esquema da estrutura química da amilopectina (ramificada) apresentando ligações α -1,4 e α -1,6.....	24
4	Evolução da Produção da raiz de mandioca no Brasil.....	31
5	Mecanismo de ação da α -amilase sobre os componentes do amido. (A) Amilose; (B) Amilopectina.....	35
6	Mecanismo de ação da glucoamilase sobre os componentes do amido. (A) Amilose; (B) Amilopectina.....	37
7	Representação da estrutura terciária da α -amilase de <i>B. licheniformis</i> . O cálcio e os íons de sódio ligadas à proteína em sua forma nativa são mostrados. Domínio A, mostrado em vermelho, o domínio B é de cor azul e o domínio C na cor verde.....	39
8	Representação da estrutura da glicoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> var. X100.....	40
9	Volume final da produção de α -amilase com meio otimizado (A); Volume final da produção de glicoamilase (B); Sistema de filtração à vácuo (C).....	63
10	Sistema de microfiltração em membranas de 0,2 μ m para a retirada de células e/ou material particulado (A e B); Sistema de concentração em cartucho com membrana de corte (<i>cut-off</i>) de 30 kDa (C e D).....	64
11	Fluxograma representativo do processo de estudo da hidrólise enzimática da fécula de mandioca.....	67
12	Diagrama de Pareto do delineamento <i>Plackett & Burman</i> I utilizada para avaliação da influência das variáveis da composição do Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	77
13	Diagrama de Pareto do delineamento <i>Plackett & Burman</i> II utilizada para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	78
14	Diagrama de Pareto do delineamento Composto Central Rotacional para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	81
15	Superfície de resposta para a atividade amilolítica da glicoamilase do estudo do DCCR mostrando que tanto as concentrações de extrato de levedura quanto de biotina.....	83
16	Curva de contorno para a atividade amilolítica da glicoamilase.....	83
17	Diagrama de Pareto do delineamento <i>Plackett & Burman</i> I utilizada para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima α -amilase.....	85
18	Diagrama de Pareto do Fatorial Fracionado da enzima α -amilase.....	88
19	Diagrama de Pareto do DCCR I da enzima α -amilase.....	89
20	Diagrama de Pareto do delineamento Composto Central Rotacional para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima α -amilase.....	92
21	Superfície de resposta para a atividade amilolítica da α -amilase do estudo do DCCR II mostrando que tanto as concentrações de tampão fosfato e de extrato de levedura apresentam-se em área amplamente otimizada.....	94
22	Curva de contorno para a atividade amilolítica da α -amilase do estudo do DCCR II mostrando que tanto as concentrações de tampão fosfato e de extrato de levedura apresentam-se em área amplamente otimizada.....	94
23	Diagrama de Pareto do delineamento <i>design Simplex-centroid</i> para determinação do volume de mistura das amilases para hidrólise da fécula de mandioca.....	98
24	Superfície de resposta do delineamento <i>design Simplex-centroid</i> para determinação do volume de mistura das amilases para hidrólise da fécula de mandioca.....	99

25	Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCRI) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	100
26	Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I) para otimização da relação sólido:líquido.....	101
27	Curva de contorno do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I) para otimização da relação sólido:líquido.....	101
28	Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	103
29	Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	103
30	Curva de contorno Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	104
31	Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR III) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	106
32	Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DDCR III) para otimização da relação sólido:líquido.....	107
33	Curva de contorno Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR III) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	107
34	Perfil cinético da eficiência de hidrólise da fécula de mandioca utilizando amilases recombinantes.....	108
35	Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado das amilases recombinantes de fécula de mandioca, em fermentômetro, utilizando levedura comercial.....	109

LISTA DE TABELAS

1	Teores de amilose e amilopectina em diversas fontes amiláceas.....	p. 23
2	Produção, área colhida e rendimento da Mandioca – Brasil – 2017.....	p. 25
3	Composição química da raiz de mandioca.....	p. 32
4	Enzimas envolvidas na hidrólise do amido.....	p. 44
5	Composição do Meio YPD para manutenção da linhagem das leveduras em placas de Petri e meio líquido.....	p. 54
6	Composição do para aumento de massa celular.....	p. 55
7	Composição do Meio Padrão da <i>Invitrogen</i> estabelecido para indução da expressão das proteínas heterólogas.....	p.55
8	Níveis do <i>Plackett & Burman</i> I utilizada para avaliação da influência conjunta das variáveis da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	p. 57
9	Níveis do <i>Plackett & Burman</i> II utilizada para avaliação da possibilidade da retirada dos componentes que apresentaram efeito negativo e não significativo em resposta ao PBI da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	p. 58
10	Níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para validação da otimização do Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	p.58
11	Níveis do <i>Plackett & Burman</i> I utilizada para avaliação da influência conjunta das variáveis da composição Meio Padrão da enzima α -amilase.....	p.58
12	Níveis do Fatorial Fracionado utilizada para avaliação da possibilidade da retirada dos componentes que apresentaram efeito negativo e não significativo em resposta ao PBI da composição Meio Padrão da enzima α -amilase.....	P.59
13	Níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I) para otimização do Meio Padrão da enzima α -amilase.....	p.60
14	Níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para validação da otimização do Meio Padrão da enzima α -amilase.....	p.60
15	Valores das concentrações do meio otimizado da enzima α -amilase.....	p.62
16	Valores das concentrações do meio otimizado da enzima glicoamilase.....	p.62
17	Níveis do Delineamento experimental de mixtura <i>simplex-centroid</i> para o estudo das cargas enzimáticas na hidrólise do amido de fécula de mandioca para condição ideal de hidrólise.....	p. 66
18	Fatores e níveis do DCCR para otimização do carregamento sólido:líquido.....	p. 69
19	Fatores e níveis do DCCR II para otimização do carregamento sólido:líquido.....	p. 69
20	Fatores e níveis do DCCR III para otimização do carregamento sólido:líquido.....	p.70
21	Resultado da atividade do PBI da enzima glicoamilase para otimização dos componentes do Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	p.76
22	Tabela de efeitos para a resposta do <i>Plackett & Burman</i> I da enzima glicoamilase.....	p.77
23	Resultado do PBII da enzima glicoamilase para otimização dos componentes do Meio Padrão da enzima glicoamilase.....	p.79
24	Tabela de efeitos para a resposta do <i>Plackett & Burman</i> II da enzima glicoamilase.....	p.79
25	Resultado da atividade da enzima Glicoamilase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional para otimização do meio.....	p.80
26	Análise de ANOVA das atividades a enzima Glicoamilase Resultado da atividade do Delineamento Composto Central Rotacional.....	p.81
27	Coeficiente de Regressão para a resposta da enzima Glicoamilase.....	p. 82
28	Resultado da atividade do PB I para otimização dos componentes do Meio Padrão da enzima α -amilase.....	p. 85
29	Tabela de efeitos para a resposta do <i>Plackett & Burman</i> I da enzima α -amilase.....	p.86
30	Resultado do Fatorial Fracionado da enzima α -amilase para otimização dos componentes do Meio Padrão.....	p.87
31	Tabela de efeitos para a resposta do Fatorial Fracionado da enzima α -amilase.....	p.87

32	Resultado da atividade da enzima α -amilase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I) para otimização do meio.....	p.88
33	Tabela de efeitos para a resposta do DCCR I da enzima α -amilase.....	p.90
34	Análise de ANOVA da atividades a enzima α -amilase Resultado da atividade do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I).....	p.90
35	Resultado da atividade da enzima α -amilase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional DCCR II para otimização do meio.....	p.91
36	Análise de ANOVA das atividades a enzima α -amilase Resultado da atividade do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II).....	p.92
37	Coeficiente de Regressão para a resposta da enzima α -amilase no DCCR II.....	p.93
38	Resultado da concentração de glicose do <i>design Simplex-centroid</i> para determinação do volume as amilases para hidrólise da fécula de mandioca.....	p.97
39	Análise de ANOVA <i>design Simplex-centroid</i> para determinação do volume de mistura das amilases para hidrólise da fécula de mandioca	p.97
40	Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCRI) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	p.100
41	Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR II para otimização da relação Sólido:Líquido.....	p.102
42	Análise de ANOVA do Delineamento Composto Central Rotacional do estudo da hidrólise (sólido:líquido) (DCCR II).....	p.104
43	Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR III para otimização da relação Sólido:Líquido.....	p.105
44	Análise de ANOVA do Delineamento Composto Central Rotacional do estudo da hidrólise (sólido:líquido) (DCCR III).....	p.106
45	Coeficiente de Regressão para a resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR III) para otimização da relação Sólido:Líquido.....	p.106
46	Tabela comparativa de teores alcoólicos obtidos em outras pesquisas.....	P.110
47	Resumo com os dados da produção do etanol.....	p.111

INTRODUÇÃO

Até 2040 o aumento da demanda de energia do planeta deve chegar a 30%. Os motivos para essa estimativa estão diretamente ligados a economia global que cresce a taxa média de 3,4% ao ano; a população que se expande de 7,4 bilhões hoje para mais de 9 bilhões em 2040 e o processo de urbanização. Essa demanda crescente confere novos desafios que repercutem à geração e consumo de energia. Atualmente as fontes renováveis de energia atendem apenas a 40% desse aumento de demanda. O uso do petróleo continua a crescer até pelo menos mais duas décadas, embora a um ritmo cada vez menor, pois a busca de estudos e aplicações de fontes de energia de matérias-primas alternativas renováveis se intensificaram como, por exemplo, as biomassas. Simultaneamente, estudos revelam elevação das concentrações de gás carbônico na atmosfera acarretando provavelmente o aquecimento global, e como consequência, as regiões da Terra apresentam mudanças climáticas bastante rigorosas (EPE, 2018).

O Brasil, com sua agigantada extensão territorial, associada às excelentes condições edafoclimáticas, é considerado um paraíso para produção de biomassa para fins alimentares, químicos e energéticos.

Ainda segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE) (2018), para 2030 a demanda de etanol no Brasil é de 24,7 bilhões de litros, no entanto tão-somente o álcool produzido a partir do caldo de cana, o chamado etanol de primeira geração, não será capaz de suprir essa demanda, confirmando a necessidade do uso de outras fontes para que seja alcançada.

Em 1997, foi estabelecido um acordo que visava a redução das emissões gasosas, o Protocolo de Kyoto, que em 2015 foi substituído pelo Acordo de Paris, o tratado foi o pioneiro que comprometeu os países industrializados com a redução dos gases de efeito estufa, incentivando largamente a utilização de biomassas como fonte de energia alternativa ao petróleo. Nesta conjuntura, a Pesquisa e Desenvolvimento acerca dessas matérias-primas foram intensificadas e bastante diversificadas, para a devida substituição às fontes fósseis, em particular as chamadas biomassas residuais. Com a finalidade de minimizar esta realidade, o uso de matérias primas como amido ou outros produtos da biomassa, oriundos de resíduos agroindustriais para a produção de etanol, tem sido bastante impulsionado.

O amido é um substrato renovável, biodegradável e não tóxico amplamente utilizado nas indústrias alimentícias, têxtil, para a elaboração de compostos

farmacêuticos, na produção de resinas naturais e materiais termoplásticos biodegradáveis. Sendo possível também sua utilização na produção de álcoois finos para o preparo de bebidas e de álcool carburante. Este substrato tem demonstrado possibilidade de proporcionar bons rendimentos do produto quando tratados com enzimas, em detrimento dos tratamentos químicos. Assim o uso de enzimas é de considerável importância e atrativo, por estas serem produzidas por uma diversidade de microrganismos e industrialmente por diferentes técnicas incluindo fermentação submersa, contínua e a fermentação em estado sólido, numa quantidade e qualidade desejada, utilizando os microrganismos naturais ou os bioengenheirados.

Enzimas são bastante exploradas pela indústria biotecnológica, onde são amplamente utilizadas em várias aplicações. Estes biocatalizadores de origens microbiana, possuem vantagens sobre equivalentes de origem animal ou vegetal, tais como: menores custos de produção, produção em larga escala industrial, amplo aspecto de características físico-químicas e elevada especificidade da ação biocatalisadora. O emprego de enzimas amilolíticas na produção de etanol a partir de substratos amiláceo, mostra-se vantajoso, por trazer redução dos custos, permitindo que as etapas de sacarificação (hidrólise do amido em glicose) e fermentação sejam realizadas concomitantemente, melhorando a eficiência da conversão do amido.

Embora a hidrólise enzimática tenha se consolidado como o procedimento mais efetivo pelos rendimentos observados, por não gerar inibidores formados na hidrólise ácida e pelas vantagens ambientais, a sua viabilidade econômica está relacionada aos custos das enzimas, que no Brasil são obtidas em sua grande maioria pela importação, elevando, portanto, os custos do tratamento enzimático.

Devido a esta forte dependência do setor de produção de proteínas brasileiro ao mercado internacional, faz-se necessário o desenvolvimento de processos e formas variadas de produção interna. Para tanto, o emprego da biotecnologia é indispensável na tentativa de se desenvolver meios modernos e satisfatórios, que potencializem o desenvolvimento e a consolidação do mercado de produção de enzimas no Brasil.

As enzimas se fazem necessárias para a degradação de algumas biomassas, por exemplo, os tipos de amidos.

Segundo Buckeridge *et al.* (2009) o amido é um polímero composto por unidades de glicose repetidas denominadas ligações glicosídicas α (1,4) está dentre as biomassas que são utilizadas para obtenção do etanol. As plantas utilizam o amido

como principal reserva de energia, armazenando os carboidratos na forma de grânulos nas sementes, frutos, tubérculos e raízes; dependendo da planta.

Amidos de plantas diferentes divergem em estrutura, assim como amidos de uma mesma planta podem ser diferentes. Trata-se de um substrato renovável, biodegradável e não tóxico, amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, têxtil, para a elaboração de compostos farmacêuticos, na produção de resinas naturais e materiais termoplásticos biodegradáveis; nestas últimas aplicações utiliza-se o amido modificado, acetilação, eterificação e a esterificação, são alterações que vem sendo usadas para os amidos na indústria de alimentos, papéis e filmes, essas alterações conferem ao amido modificações estruturais que podem ser aplicadas, como por exemplo na produção de eletrólitos sólidos poliméricos. (CEREDA; VILPOUX, 2003d; HONORATO *et al.*, 2015).

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

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

Portanto, faz-se justificar este trabalho, a busca permanente por insumos que possam colocar o Brasil em situação competitiva frente aos enormes desafios do mercado industrial consumidor de volumosas demandas de enzimas, cuja maior parte deste volume é importado aumentando o custo dos processos e, consequentemente, dos produtos finais. Neste estudo específico, vislumbrou-se a oportunidade de usar a biomassa da mandioca, para a produção de etanol, que possui requisitos importantes que ofereceram respostas positivas a esta pesquisa, com capacidade de oferecer

enfrentamento mercadológicas frente à demanda industrial existente. Ressalta-se que durante o processo de beneficiamento da mandioca produz-se um grande volume de refugo, que é uma das matérias primas usadas para a produção do álcool de amido.

No Amazonas, local onde este trabalho foi realizado, a geração de refugo é grande, assim, iniciativa deste estudo demonstra a oportunidade de solucionar também o problema de lixo ambiental evidenciado, principalmente, com descarte das sobras das casas de farinha no interior, aproveitando este resíduo como matéria prima para a produção de energia limpa. Os resultados alcançados neste estudo foram pujantes, e a otimização dos meios de produção das enzimas leva a incrementação dos processos industriais minimizando e/ou solucionando o problema da baixa produção de enzimas no Brasil, possibilitando equilibrar a balança de oferta e procura no território nacional. Além de contribuições para o desenvolvimento científico e tecnológico regional e nacional através da geração dos produtos desenvolvidos ou de novas tecnologias, esse estudo tem a notória importância e primordial contribuição na formação e capacitação de recursos humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O amido

As características químicas e físicas do amido o destacam dos demais carboidratos. Ele é a reserva alimentar predominantes dos vegetais, fornecendo 70-80% das calorias de consumo no mundo. O amido e seus respectivos hidrolisados são constituídos principalmente por carboidratos digeríveis e/ou fermentáveis. Os amidos comerciais são obtidos a partir de sementes de cereais, principalmente de milho comum, milho ceroso, milho de alto teor de amilose, trigo, arroz, tubérculos e raízes, em especial a batata e a mandioca (FENNEMA, 2010). Os amidos modificados apresentam numerosas aplicações, incluindo a promoção de adesão e a função ligante, turbidez, polvilho, elemento de recobrimento (filme de cobertura), reforçador de espuma, gelificante, vitrificante, retentor de umidade, estabilizante, texturizante e espessante (MORAES, 2004; GÖRGENS & BRESSLER, 2015).

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

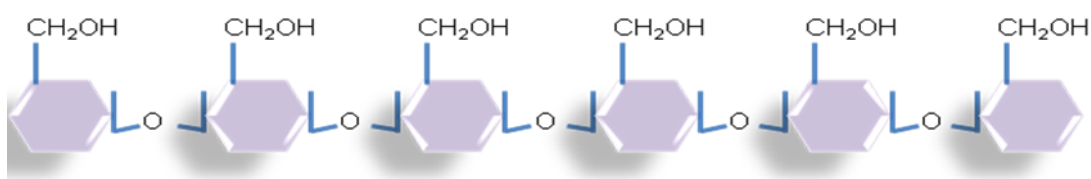


Figura 1: Esquema da Estrutura Química do Amido mostrando as unidades monoméricas de glicose – adaptado (FENNEMA, 2010)

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

cozida. Aquecendo-se uma suspensão de 5% dos principais grânulos de amidos nativos a 80 °C, sob agitação, obtém-se uma dispersão de alta viscosidade que pode ser chamada de goma, ou gelatinização. Uma segunda particularidade é que a maioria dos grânulos de amido é composta de uma mistura de dois polímeros: um polissacarídeo linear chamado amilose, e um polissacarídeo ramificado, chamado amilopectina (DENARDIN & SILVA, 2008; CINELLI, 2012).

As moléculas de amido, como todas as outras moléculas de polissacarídeos, podem ser despolimerizadas por ácidos a quente, porém para hidrolisar o amido em glicose, são usadas três ou quatro enzimas, sendo elas α -amilase, β -amilase, glicoamilase e pipulanase (FENNEMA, 2010). Diversos organismos apresentam capacidade de produzir enzimas que clivam o amido e assim liberando glicose que é utilizada no metabolismo energético dos mesmos.

A glicose, que é o monômero que estrutura o amido, apresenta-se organizada em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina. De acordo com Ball *et al.* (1998) a amilose se dispõe linearmente praticamente com a ausência de ramificações ao longo de sua cadeia apresentando ligações glicosídicas do tipo α (1,4) e uma parte mínima que não chega a 1% da estrutura tem ramificação α (1,6). Enquanto que a amilopectina é considerada uma das maiores biomoléculas conhecidas, apresenta um número elevado de ramificações e possui cadeias de resíduos de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo α (1,4) com aproximadamente 5% de ramificações α (1,6).

2.1.1. Amilose

Embora a amilose seja essencialmente uma cadeia linear de unidades de α -D-glicopiranosil unidas por ligações (1 $\rightarrow$ 4), muitas moléculas de amilose contêm um pequeno número de ramificações ou radicais conectados por ligações α -D-(1 $\rightarrow$ 6), nos pontos de ramificação (figura 2). É possível que, uma em 180 a 320 unidades, ou 0,3-0,5% das ligações, sejam ramificações. As ramificações são separadas por longas distâncias, de modo que as propriedades da amilose são aquelas da molécula linear. As moléculas de amilose apresentam massa molecular média de 10⁶ kDa (DENARDIN & SILVA, 2008; XU *et al.*, 2016).

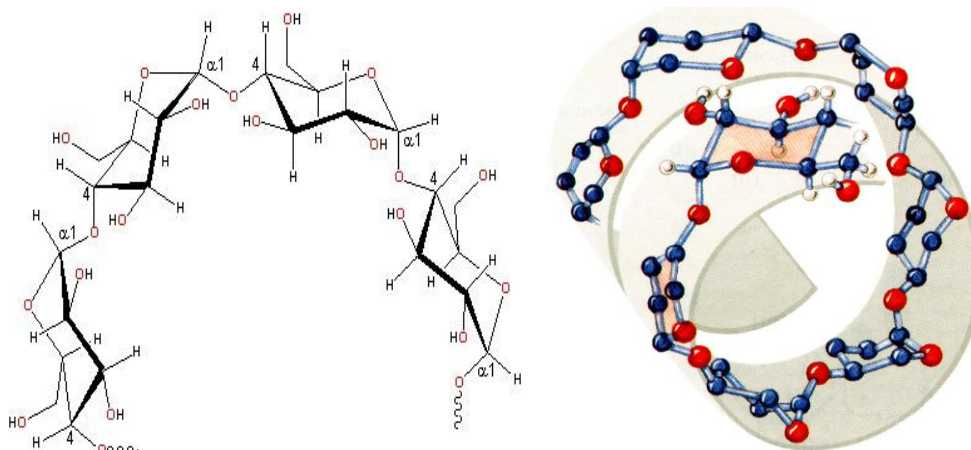


Figura 2: Esquema da estrutura química e helicoidal da molécula de amilose (NELSON & COX, 2011)

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

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

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

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

Fonte: Alexander, 1995

2.1.2. Amilopectina

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

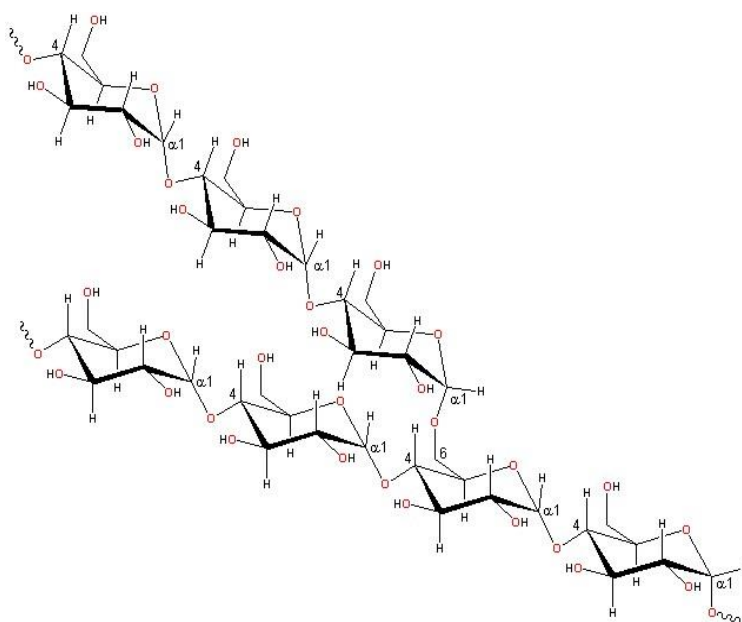


Figura 3. Esquema da estrutura química da amilopectina (ramificada) apresentando ligações α -1,4 e α -1,6 (NELSON & COX, 2011)

A amilopectina está presente em todos os amidos. Ela constitui mais ou menos 75% da maioria dos amidos comuns. Alguns amidos são constituídos inteiramente de amilopectina, sendo denominados como cerosos ou amidos de amilopectina. O milho ceroso, primeiro grão reconhecido entre os que contêm amido constituído apenas por amilopectina, é assim denominado porque, quando cortado, a superfície do miolo do grão apresenta aparência vítrea ou cerosa. A maioria dos outros amidos constituídos

apenas de amilopectina é chamada de ceroso, embora, no caso do milho não haja cera em sua constituição. A amilopectina de batata é a única, entre os amidos comerciais, a possuir mais do que quantidades-traço de grupamentos éster fosfato. Esses grupos éster fosfato encontram-se ligados com mais frequência (60-70%) a uma posição O-6, com outro terço na posição O-3. O grupo éster fosfato ocorre aproximadamente uma vez a cada 215-560 unidades de α -D-glicopiranosil (DENARDIN & SILVA, 2008).

2.2 Fécula de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

A *Manihot esculenta* Crantz, conhecida como mandioca, é uma cultura de grande importância socioeconômica no Brasil, cultivada sob as mais diversas condições edafoclimáticas em todas as regiões do território nacional, conforme expresso na tabela 2.

Tabela 2: Produção, área colhida e rendimento da Mandioca – Brasil - 2017

	Área Colhida (ha)	Quantidade Produzida (t)	Rendimento (t/ha)	Participação na Produção (%)
Brasil	1.314.851	18.876.470	14,36	-
Norte	473.872	7.212.771	15,22	38,21
Nordeste	454.157	3.881.931	8,55	20,56
Sul	220.575	4.765.265	21,60	25,24
Sudeste	101.018	1.830.266	18,12	9,70
Centro-Oeste	65.229	1.186.237	18,19	6,28

Fonte: Produção Agrícola Municipal- 2018- IBGE

A importância dela em algumas regiões e localidades nacionais define a subsistência de muitas populações, povoados e comunidades, sendo a mandioca nessas localidades responsável pela renda de inúmeras famílias que praticam a agricultura de base familiar. A mandioca também possui um destacado lugar na alimentação básica dessas populações e para a alimentação de animais, sendo também utilizada como matéria-prima pela indústria para produção de inúmeros produtos usados pela sociedade no cotidiano. Essa cultura tem sido plantada em pequenas propriedades rurais de base familiar para atender principalmente a alimentação de subsistência para humanos e para

a produção artesanal de goma e polvilho azedo e, as grandes propriedades produzem para fecularias, indústrias de farinha e produção de combustível. Sendo requisitada em diversos setores e atendendo uma gama de atividades de grande importância socioeconômica, esta cultura não é estável produtivamente, apresentando ao longo dos anos uma oscilação bastante significativa em relação ao preço e à área cultivada (EMBRAPA, 2018).

Em 2018, o Brasil produziu aproximadamente 18,9 milhões de toneladas, numa área de 1,31 milhões de hectares, com o rendimento de 14,36 t/ha, podendo ser observada uma diminuição de 10,47% na produção em relação ao ano de 2017. A mandioca é produzida em todo o território nacional, mas é na Região Norte que se concentra a maior parte da produção e dos consumidores derivados dessa cultura.

Em 2018, nacionalmente falando, a participação do Norte na produção de foi de 38,21%. Em seguida, vê-se a região Sul com 25,24% e a Nordeste com 20,56% (IBGE 2018).

A produção está primordialmente concentrada em quatro estados, que juntos somam 52% da produção brasileira, cada um deles numa região diferente. O IBGE (2019) identifica a contribuição do Norte com o equivalente a 4,2 milhões de toneladas, trabalhando com milhares de casas de farinha de porte pequeno, mas que responde pela maior produção de farinha do Brasil. Embora o Norte apresente aquela produção de mandioca, essa produção está aquém do enorme potencial da cultura, devido aos baixos níveis de tecnologia e de insumos utilizados no cultivo e raras tecnologias utilizadas no processo de beneficiamento que, juntos, se utilizados, poderiam proporcionar melhores resultados que os atuais. Depois, tem-se o Paraná (Sul) com pouco mais de 3,3 milhões de toneladas, o estado do Maranhão (Nordeste) com 1,3 milhões de toneladas e o estado de São Paulo (Sudeste) com 1,0 milhões de toneladas.

Essa cultura é muito rica em carboidratos (cerca de 30%), dos quais 25-40% é o amido (MARTINEZ; FEIDEN, 2017). Em cada tonelada de raiz processada nas fecularias produz-se em torno de 930 kg de farelo e a umidade chega a 85% no produto desse processo. Após a secagem, este resíduo pode apresentar, em média, 11,5% de fibras e 75% de amido.

Por força da Lei 12.651/2012 as áreas destinadas ao plantio, também denominadas áreas úteis, foram reduzidas nas propriedades agrícolas buscando recuperação de APP (Área de Preservação Permanente) e ARL (Área de Reserva

Legal). Este fator legal contribuiu para a diminuição do plantio dessa cultura que, especialmente, na região Norte, é uma cultura nômade.

Com o avançar dos estudos, é possível perceber que, comparada a outras culturas igualmente importantes, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) possui alta produtividade e grande eficiência biológica como fonte de energia (EMBRAPA, 2018), é de fácil cultivo, possui baixo custo de produção, de fácil adaptabilidade nos diversos climas e solos das Regiões do País, sendo cultivada de Norte a Sul no País, sendo resistente ao ataque de pragas, (MARTINEZ; FEIDEN, 2017).

De acordo com Otsubo e Farias (2002) a mandioca desempenha importância fundamental na alimentação humana e animal, serve de matéria-prima para a indústria em vários segmentos, representando ampla geração de emprego e diversidade de renda no campo, em especial para os produtores rurais de base familiar.

De acordo com Del Bianchi (1998), a mandioca utilizada na indústria gera um enorme volume de resíduos que impactam o meio ambiente de forma significativa e danosa. Pode-se apontar como os principais resíduos causadores desse impacto, dois tipos de resíduos: a) sólidos: a casca marrom, entrecasca, descarte, crueira, fibra, bagaço e varredura; b) e resíduos líquidos como: a água de lavagem; manipueira (água vegetal ou água de prensa) e água de extração de fécula.

2.2.1 A mandioca e sua agroindustrialização

Com os novos conceitos econômicos, um produto passou a ser visto como um todo, sendo cada etapa do processo significativa para sua aceitação no mercado, que descarta práticas abusivas ao meio ambiente, assim como, determinadas partes do processo passaram a ser vistas não mais como descartes, mas como potenciais receitas, passando a serem aproveitadas em outros produtos, processos e nichos de mercado, buscando-se alto aproveitamento dos resíduos gerados em determinados segmentos (CEREDA, 1996).

Ainda conforme Cereda (1996), dependendo do tipo de processamento das raízes de mandioca no Brasil, a indústria gera resíduos tanto sólidos como líquidos, entre os líquidos, destaca-se a manipueira, resíduo altamente tóxico e poluente por possuir ácido cianídrico. Entre os resíduos sólidos, encontra-se o farelo que é o principal resíduo produzido nas fecularias, geralmente, é jogado em rios ou cursos de água ou até mesmo deixado em valas que extravasam e carregam grande carga orgânica para os mesmos, o que representa um grave problema ambiental e social.

A partir das observações quanto às potenciais características da composição da mandioca e da quantidade de resíduos gerados durante seu processo, inúmeras pesquisas são iniciadas com expectativas de se dar nobre destino aos seus resíduos que não seja o lixo e criação de problemas sociais e ambientais. Cereda (1996) caracterizou o farelo da mandioca e observou nele um percentual 85% de umidade inicial, 80% de amido, 15% de fibras, 2% de proteína, 1,6% de cinzas, 1% de açúcares e 0,8% de matéria graxa expressos na base seca, observou ainda que seu pH e acidez apresentam variações importantes relacionadas à fermentação natural do resíduo.

O que torna a produção de etanol por fermentação a mais econômica é a disponibilidade da matéria-prima (resíduos) existente em todo o País, contendo em sua constituição carboidrato e açúcar, que são os fatores potenciais para a produção do etanol, (MARTINEZ; FEIDEN, 2017).

Mesmo que uma matéria-prima contenha carboidratos compatíveis para a fermentação alcoólica como glicose, sacarose, celulose, amido, entre outros, é necessário verificar alguns pontos de impacto econômico que poderão viabilizar ou não, um negócio ou processo.

Neste quesito, as análises recaem sobre o custo de aquisição do insumo (matéria-prima), facilidade durante o processo de transformação (pré-tratamento), ter alta capacidade de rendimento de álcool, disponibilidade de matéria-prima no mercado, possibilidade de expandir a produção fonte da matéria-prima, fonte de energia empregada no processo e energia disponível enquanto durar o processo (ZIM,2010).

Os amidos provenientes da mandioca possuem alta capacidade de aplicabilidade em diversos segmentos industriais, em especial a de alimentos, levando-se em consideração suas características físicas e químicas, que são influenciadas também por disposições ecológicas ou agrônomicas. As aplicações industriais dos amidos são, entretanto, dependentes de suas propriedades físicas e químicas, as quais variam de uma cultura para outra, ou são influenciadas por fatores ecológicos ou agrônomicos (EMBRAPA, 2018).

2.2.2 A mandioca e a produção de bioetanol

Historicamente em momentos de crises econômica, de guerra e energética o Brasil já utilizou a mandioca para a produção de álcool. Porém, de acordo com Ostrowski *et al.* (2006), passado esses momentos abandonou-se essa prática onde a

mandioca era a matéria-prima e prevaleceu o uso da cana-de-açúcar para a produção do etanol.

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

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

De acordo com Camili (2010), a produção de bioetanol em escala comercial se sustenta por duas plataformas tecnológicas: a) utiliza matérias-primas doces, fermentáveis, a exemplo da cana-de-açúcar e a beterraba açucareira, b) ou matérias-primas de base amilácea como a mandioca, o milho e o trigo, cujo amido deve ser convertido em açúcares (sacarificado) em etapa anterior a da fermentação.

Gonçalves *et al.* (2007), afirmam que a mandioca possui um alto teor de carboidratos, podendo substituir a própria cana de açúcar na produção de álcool, assim como é esperado um elevado teor de açúcar na mandioca dada a existência de alta quantidade de amido, cujo resultado final da hidrólise se constitui basicamente em glicose. Esses autores afirmam ainda que é possível que a produção de álcool carburante compense o investimento realizado.

Saito *et al.* (2006), afirmam que a mandioca processada contém de 60 a 70% de farelo em peso seco, e que, em média, uma agroindústria de produção de fécula de mandioca produz em torno de 930 kg de farelo contendo, aproximadamente, de 88 a 90% de umidade para cada 1000 kg de raiz processada, e apresenta concentração de

amido residual que varia entre 55,8 e 78,1 kg. Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de recuperar o amido residual a partir de tratamento biológico ou físico, com o intuito de agregação de valor à matéria-prima de consumo, visando a ampliação da capacidade de produção de biocombustíveis de segunda geração.

A recuperação deste amido residual por tratamento físico ou biológico é que tem sido objeto de pesquisas visando à melhoria dos processos, com o objetivo de agregar valor à matéria prima consumida e possibilitando ampliar a produção de biocombustíveis de primeira e segunda geração, cuja principal vantagem em comparação aos de primeira geração é a utilização de insumos (matérias-primas) não comestíveis, portanto, não concorrem com o setor de alimentos, (NIGAM; SINGH, 2011).

Outra vantagem é que a matéria-prima a ser usada no processo pode ser criada somente para fins de geração de energia, e, se, caso usado tecnologias como as desenvolvidas pela Embrapa (2018), sendo uma delas a tecnologia de processo que preconiza a adoção de práticas simples de manejo, e tem comprovado ser capaz de aumentar a produtividade da cultura da mandioca, sendo orientada apenas para mudanças nos procedimentos de cultivo, há a possibilidade real da obtenção de uma maior produtividade por área plantada, onde uma maior quantidade de material orgânico pode ser transformada para produção de biocombustíveis, o que torna eficiente o uso do solo.

Diversos estudos estão sendo desenvolvidos a favor da cultura da mandioca pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Há pelo menos 20 anos alguns pesquisadores da EMBRAPA em viagens de coletas de algumas espécies de plantas na Amazônia depararam-se com uma variedade de mandioca diferente, essas raízes apresentam açúcares prontamente disponíveis, porém necessitam de amilases para que a fração amilácea presente nas raízes seja também transformada em açúcar e o mesmo fique disponível fazendo com que a rentabilidade de material fermentável aumente. Sendo que dos açúcares presentes o de maior quantidade é a glicose; a utilização dessa mandioca que recebeu o nome de açúcarada, doce ou mandiocaba para a obtenção de álcoois, tornaria o processo de hidrólise do amido desprezível eliminando assim etapas do processo de transformação de açúcares em álcoois (ERENO, 2008; SOUZA, 2014). Na região Norte, a oferta de álcool apresenta muitos problemas quanto a logística e transporte, visto que a maior parte das usinas estão concentradas no Centro-Sul.

Uma solução viável seria a produção de álcool a partir da mandioca doce variedade essa que possui uma boa quantidade de açúcares na raiz e menor quantidade de amido que também podem sofrer ação das amilases aumentando a quantidade de matéria açucarada, tornando-se assim, ideal para produção deste combustível. Além disso, a diversidade de solos em que essa mandioca é plantada demonstra que essa espécie está bem adaptada as condições climáticas da região Norte uma vez que a mandioca doce é uma planta mutante da mandioca comum. Contudo, são necessárias mais pesquisas tanto no aspecto industrial quanto no agrônômico, pois, mesmo sendo originária da Amazonia, as mandiocabas ainda precisam ter algumas de suas características aprimoradas a fim de se tornarem mais efetivas na conversão dos açúcares em álcool combustível. Há ainda o benefício de introduzir cultivares coletadas na região Norte, em razão de serem plantas bem adaptadas e tolerantes à grande parte de pragas e doenças regionais (EMBRAPA, 2018).

De acordo com os Relatórios produzidos pela CONAB (2019), apesar da pressão de baixa no preço da mandioca, os produtores insistem no seu plantio, responsável por um aumento de área plantada em 2019 de 1,6% em relação ao ano anterior, dados do IBGE (2019), demonstrando que os produtores entendem que a cultura é mais que importante para sua economia familiar e, conseqüentemente para o país de modo geral. Conforme mostra a figura 4 é necessário soerguer a cultura para desenvolver novos projetos que envolvam seus potenciais, em especial, o de matriz energética, pois, neste momento, até a produção de farinha e fécula estão comprometidos.

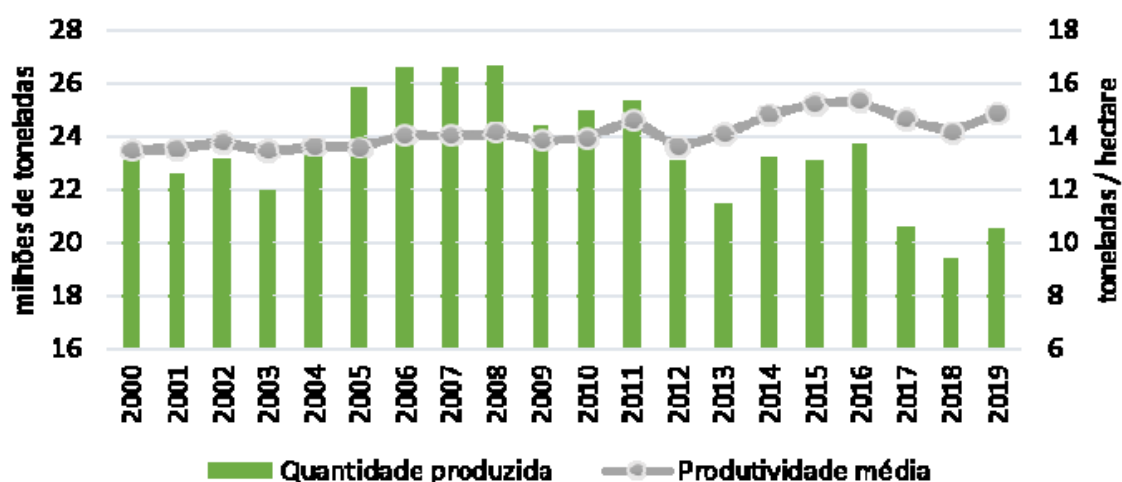


Figura 4. Evolução da produção da raiz de mandioca no Brasil

Fonte: CONAB. (2019) e IBGE (2019)

Pode-se dizer que a produção de mandioca com fins específicos para a produção de etanol é insignificante neste momento. Segundo o CONAB (2019) a maior parte da mandioca produzida no País de acordo com a figura 4 são destinadas à produção de farinha e fécula, porém, dado uma alta taxa de retorno do investimento, entende-se ser viável o plantio da cultura para este fim, pois as pesquisas e estudos de viabilidade econômica apontam para grandes benefícios tanto sociais, como econômicos e ambientais envolvendo toda a cadeia produtiva do etanol a partir da mandioca, especialmente, o gerado a partir e resíduos agroindustriais que é rico em amido e com cadeia produtiva estabelecida e consolidada em todo o País, o que possibilita que este insumo (mandioca) e seus resíduos formem uma cadeia completa e fechada com início (produtores rurais), meio (agroindústrias - farinheiras e fecularia que geram resíduos – e, indústrias de transformação – que produzem o etanol) e por fim os consumidores, completando e fechando este circuito que acena com grandes perspectivas de êxito.

Fermentados ou não, os principais produtos da mandioca são ricos em amido constituinte que se apresenta como principal fonte de energia da mandioca. Na tabela 3, apresenta-se a composição química da raiz de mandioca (CEREDA & VILPOUX, 2002; JARDINE (2009).

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

Tabela 3: Composição química da raiz de mandioca

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

Fonte: Adaptado de CEREDA & VILPOUX (2003).

Segundo a ABAM (2018) uma tonelada de mandioca, com rendimento de 20% de amido, pode produzir 104 L de álcool, enquanto que a cana-de-açúcar com 140 kg de Açúcar Total Recuperável (ATR) pode produzir 85 L de álcool.

2.3 Enzimas amilolíticas ou modificadoras de amido

Desde o início do século, o estudo da viabilidade de aplicação das enzimas em processos biotecnológicos tem tido um grande destaque em nível mundial. Dentre estas enzimas, podemos destacar como as mais importantes para a biotecnologia; até o momento, as enzimas α e β amilases, amiloglucosidase e pululanase. O uso fundamental das amilases está na hidrólise do amido, principalmente, na indústria de panificação; no pré-cozimento de cereais, nas indústrias de fermentação, para a produção de álcool e bebidas alcoólica; na fabricação de xaropes de glicose, via hidrólise pelas amilases; no preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos, dentre outros (BINOD et al., 2013).

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

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

2.3.1 α -amilases

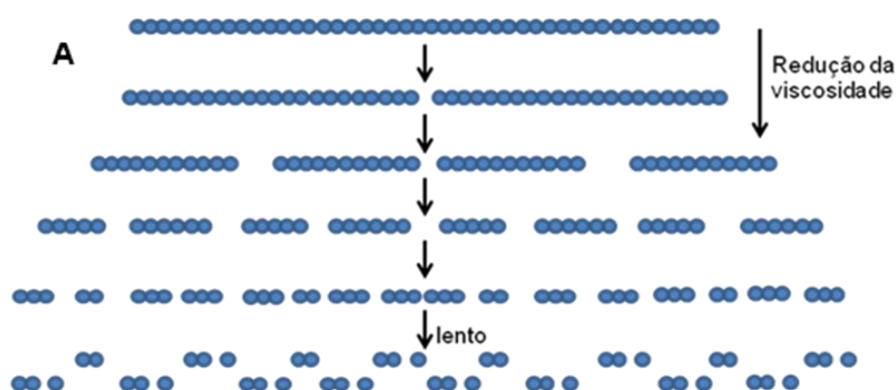
A enzima com código e nome sistemático EC 3.2.1.1; α -1,4 glicano 4-glicano-hidroxilase, respectivamente, é comumente conhecida como α -amilase. É uma endoenzima, de ação retentora $\alpha \rightarrow \alpha$ responsável, em especial, por reduzir rapidamente a massa molecular média de polímeros de amido (JUJJAVARAPU, 2019).

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

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

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

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



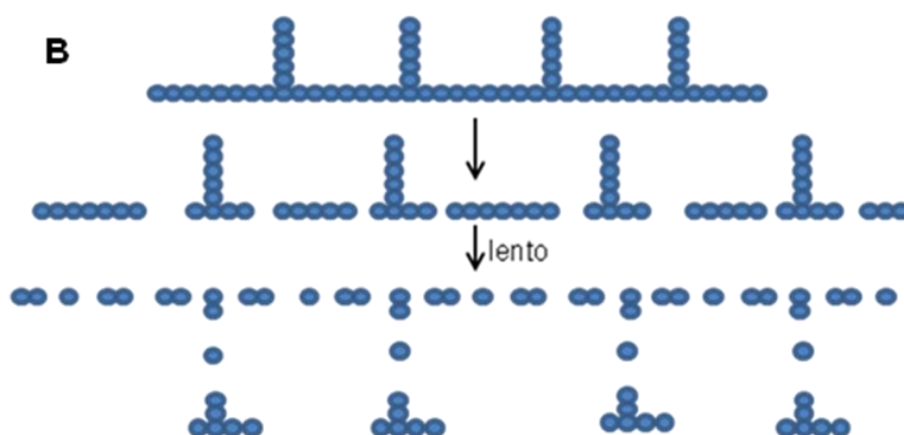


Figura 5. Mecanismo de ação da α -amilase sobre os componentes do amido.
(A) Amilose; (B) Amilopectina (BARCELOS, 2010 - adaptado)

Entre as amilases microbianas, os parâmetros ótimos são encontrados em intervalos de pH entre 4 - 7 entre 30 - 130 °C (PANDEY et al., 2005).

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

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

2.3.2 Glicoamilases

A glicoamilase (1,4- α -D-glicano glicano-hidrolase, EC 3.2.1.3), também conhecida como amiloglicosidase, é uma exoenzima $\alpha \rightarrow \beta$ inversora incluída de forma isolada na família 15 das glicosidases, que hidrolisa unidades de glicose a partir da extremidade não redutora de fragmentos lineares de amido. Embora a glicoamilase seja

seletiva para ligações α -1,4-glicosídica, ela pode agir lentamente sobre as ligações α -1,6 características da amilopectina e da pululana. Logo, o produto exclusivo da digestão exaustiva da glicoamilase é a glicose. Ela tem propriedades estruturais e mecanismo similares aos da α -amilase, incluindo os resíduos catalíticos respectivos ácido e base GLU₁₇₉ e GLU₄₀₀ (tendo-se a enzima de *Aspergillus* spp. como referência), um domínio separado para ligação de amido e um domínio de união curto. Algumas glicoamilases podem agir sobre amido nativo (cru) granular; dois resíduos (LAGZOULI, 2017).

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

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



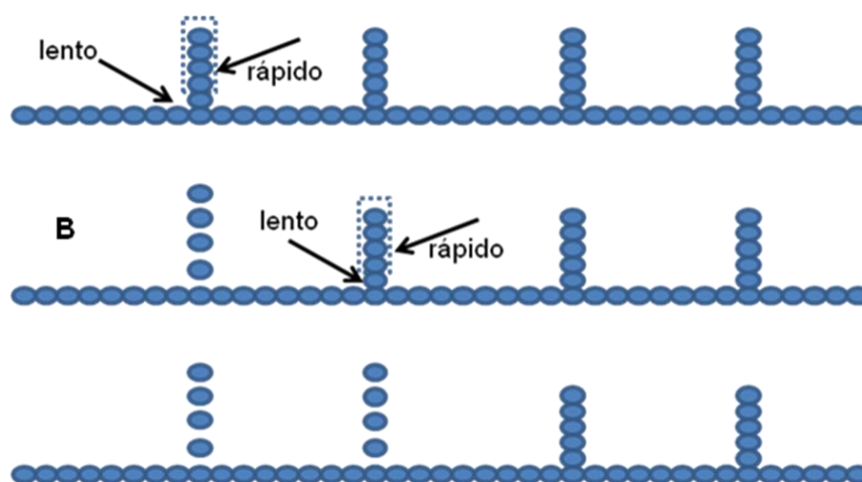


Figura 6. Mecanismo de ação da glucoamilase sobre os componentes do amido. (A) Amilose; (B) Amilopectina (BARCELOS, 2010 - adaptado)

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

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

mais essas enzimas vem assumindo grande importância industrial. Assim, a glicoamilase é usada em amidos liquefeitos com α -amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas.

2.3.3 α amilase recombinante utilizada neste trabalho

Segundo Magalhães e Souza (2010) a α -amilase de *Bacillus licheniformis* apresenta uma utilização bastante expressiva nas indústrias de processamento de amido, pois a mesma tem a capacidade de hidrolisar o amido em temperaturas relativamente amenas, podendo ultrapassar os 60 °C. *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica com um sistema de expressão de escolha de sucesso para fins acadêmicos e industriais. Neste modelo a expressão heteróloga é realizada sob o controle de um promotor forte e altamente regulável, o promotor AOX1, além de possuir um eficiente sistema de expressão/excreção da proteína sintetizada, diante dessas características esta levedura torna-se um hospedeiro bastante satisfatório quando se pretende expressar proteínas recombinantes de interesse industrial (KEHAROM *et al.*, 2016).

A α -amilase deste estudo, originada de *B. licheniformis* foi clonada e expressada em *Pichia pastoris*. O gene da α -amilase isolado da bactéria *B. licheniformis* foi inserido no genoma da levedura *P. pastoris* utilizando o vetor pPIC9 e cultivada sob agitação constante para a produção e secreção da enzima. Os transformantes de *P. pastoris* se mostraram estáveis frente a sementeiras sucessivas em meio não seletivo, características importantes em processos industriais. Sua estrutura possui três domínios: A, B e C (figura 7). O domínio A é formado por uma típica estrutura em barril (β/α)₈, o domínio B é estabelecido como uma protrusão a partir do domínio A, e o lado C-terminal do barril contém o sítio ativo e conservados sítios de ligação para o cálcio (MACHIUS *et al.*, 1998).

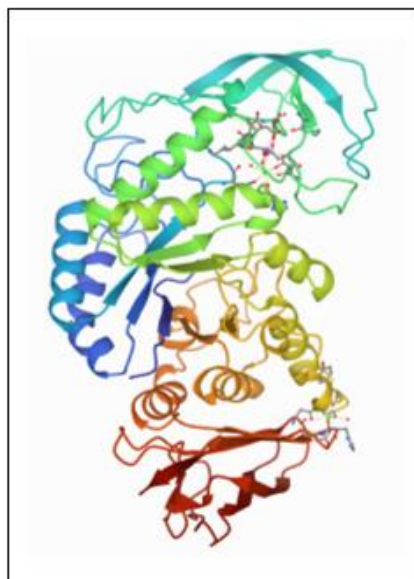


Figura 7. Representação da estrutura terciária da α -amilase de *B. licheniformis*. O cálcio e os íons de sódio ligadas à proteína em sua forma nativa são mostrados. Domínio A, mostrado em vermelho, o domínio B é de cor azul e o domínio C na cor verde (MACHIUS *et al.*, 1998).

2.3.4 Glicoamilase recombinante utilizada neste trabalho

A glicoamilase é uma das principais enzimas responsáveis pela hidrólise do amido para a formação de xarope de glicose, matéria-prima utilizada pela indústria de alimentos e como fonte de carbono em processos fermentativos diversos (BON *et al.*, 2008). A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido utilizada com sucesso para expressão de várias proteínas de interesse biotecnológico (AYED *et al.*, 2008).

Segundo CARMO (2010) que avaliou o sistema de expressão heteróloga utilizando a levedura *P. pastoris* para a produção da referida enzima; o cDNA da glicoamilase isolado do fungo *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1 foi inserido no genoma de *P. pastoris* utilizando o vetor de expressão pPIC9, baseado no promotor AOX, gerando clones recombinantes de fenótipos Mut⁺ e Mut^S cultivados sob agitação constante para a produção e secreção da proteína. As atividades das enzimas foram avaliadas utilizando o método DNS para a quantificação dos açúcares redutores resultantes da clivagem das moléculas de amido. A enzima em questão apresentou máxima atividade enzimática, no sobrenadante bruto do clone com fenótipo Mut⁺ e do clone transformante Mut^S, de 7.7 U/mL e 6.9 U/mL, respectivamente. Ambos os clones secretaram glicoamilases com 116 kDa, e mesmo apresentando diferentes poder

catalítico, bioquimicamente mostraram-se semelhantes, tendo como temperatura de atividade ótima 60°C, elevada ação catalítica em pH ácido que varia de 4.5 a 2.5 com atividade máxima em pH 3.5 e suas estabilidades frente ao pH do meio de reacional, possuindo, portanto, características desejáveis para uso em alguns processos bioindustriais. Os produtos mantêm-se estáveis quando os extratos brutos permanecem incubados a temperatura de 4 °C por 60 dias, mantendo perto de 100% da atividade máxima. A figura 8 apresenta a estrutura glicosilada da glicoamilase de *Aspergillus awamori*.

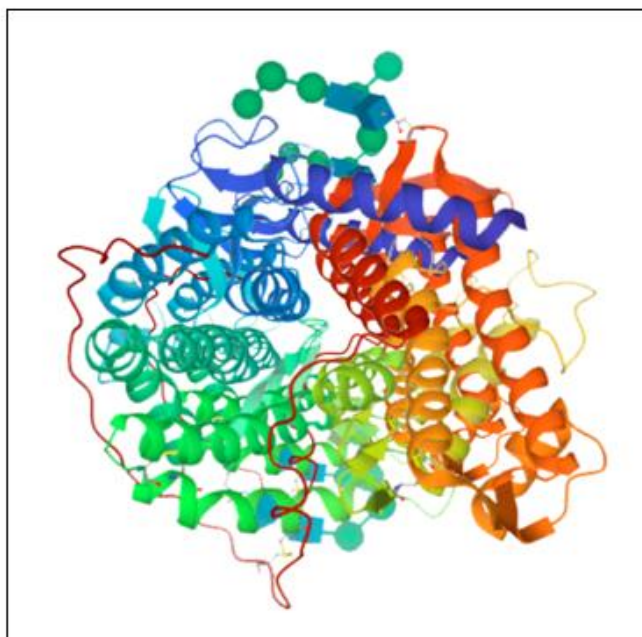


Figura 8. Representação da estrutura da glicoamilase de *Aspergillus awamori* var. X100 (ALESHIN, 1994)

2.4 Mercado global de enzimas

A biotecnologia tem se aprimorado em suas práticas, técnicas e produtos de acordo com o desafio mundial do desenvolvimento sustentável em revolucionar a indústria de forma mais ecológica, segura, saudável e, asseguradamente, eficiente, constituindo a bioeconomia como uma crescente solução aos setores que abastecem os mais diversos nichos dentro da sociedade (LOKKO *et al.*, 2017).

Os bioprocessos adentraram em setores industriais que se utilizam de recursos renováveis produzindo perspectivas maiores em biorrefinarias, agroindústrias e reaproveitamento de resíduos, onde o espaço para estas tecnologias é intimamente ligada ao crescimento econômico (PAPADAKI, 2020).

Seguindo estes propósitos, tem-se a utilização, produção e otimização de enzimas, como um produto melhor aproveitável, mais eficiente e de demanda abrangente, tanto em quantidade, quanto na qualidade dos serviços que as requerem. Tendo suas aplicações no mercado de agroindústria, alimentação – humana e animal, bebidas, biocombustíveis, biorremediação, cosméticos, couro, engenharia genética, farmacêuticos, limpeza, medicina, vestimenta, papelaria, pesquisa, dentre outras aplicações (BINOD *et al*, 2013; SANTOS *et al*, 2016; GUERRAND, 2017).

Com tantas funcionalidades, a indústria de enzimas movimenta a economia mundial de forma dinâmica com exportações e importações. Em 2012, Sarrouh *et al.*, afirmam que a turbulência econômica vivida entre 2008 – 2009 não foi sentida no mercado mundial de enzimas, que crescia moderadamente e se manteve estável em países de primeiro mundo como o Canadá, Estados Unidos, Europa Ocidental e Japão, e se ampliava em continentes como a África, Ásia e parte da Europa Oriental, estimando que em 2010 este mercado moveu 3,3 bilhões de dólares, estimando o crescimento de 6% por ano e alcançando 4,4 bilhões de dólares em 2015. As pesquisas de Singh *et al.*, em 2016, afirmam que no ano de 2014 o valor movimentado foi de 4,2 bilhões de dólares – valor esperado e dentro do previsto para 2015 – com a taxa composta de crescimento anual (TCCA) prevista em 7% - maior que a estudada anteriormente – entre os anos de 2015 e 2020, chegando ao montante de 6,2 bilhões de dólares. Um outro estudo engendrado por Prasad & Roy, 2018, elucida que o mercado global poderá atingir 6,3 bilhões de dólares em 2021 e que a TCCA seria de 4,3% durante 2016 – 2021, cujo valor aferido em 2016 ficou entre 5 – 5,5 milhões de dólares (GUERRAND, 2017).

Na América Latina, o Brasil se mostra como consumidor majoritário do mercado global de enzimas (60%) e o percentual de importações (86%) é bem maior que o de exportações (14%), evidenciando um atraso tecnológico, apesar da biodiversidade e de estudos concentrados na área de fermentação e bioprocessos necessários, que conseguem manter o país inserido no mercado mundial. Para tanto, os métodos e tecnologias utilizados estão cada vez mais otimizados e alinhados com a sustentabilidade, visto que o valor inestimável do meio ambiente brasileiro demanda

atenção e o processo de produção dos biocatalisadores está se assentando gradativamente, principalmente no setor de biocombustíveis – maior representatividade do país no mercado, equilibrando os custos de produção, manutenção, pesquisa, desenvolvimento a fim de emplacar a competitividade neste mercado (SANTOS *et al.*, 2016), cuja demanda tende a aumentar com TCCA em 5,7%, vislumbrando valores de 10,5 bilhões de dólares em 2024 (PAPADAKI, 2020).

Então a partir desses dados, é possível compreender que o Brasil é um país essencialmente importador, mostrando a ocorrência de exportações de matéria-prima e importações de produto já industrializado. Isso se deve ao fato de o país possui uma grande quantidade e variedade de matérias-primas renováveis que podem ser transformadas. Com isso, o incentivo à tecnologia enzimática no país aumentaria a representatividade comercial e econômica do Brasil no cenário internacional, que ainda se apresenta pouco expressiva.

2.5 Os meios de Cultivo

O meio de cultura é um apanhado de nutrientes fundamentais ao crescimento do microrganismo a ser estudado, contendo a fonte de energia e de todos os elementos indispensáveis à manutenção das células que lá estarão (PRADO *et al.*, 2004).

No processo fermentativo, o uso do meio é semelhante, mas com a condição de que o microrganismo será induzido a produzir a enzima de interesse para consumir os substratos solubilizados no caldo líquido, quando a fermentação for submersa (SILVA *et al.*, 2017).

Dentre os diversos meios que se pode utilizar, no caso particular da *P. pastoris*, recomenda-se o meio YPD para manutenção de colônias e o meio BMGU para crescimento celular (INVITROGEN, 2014).

O meio YPD sólido conta com as seguintes quantidades (g/L): 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose – glicose e 2% ágar.

O substrato principal deste meio é a glicose, que junto às fontes de nitrogênio extrato de levedura e peptona, influencia significativamente para o crescimento celular da colônia, uma vez que a fonte de carbono propicia o crescimento e a de nitrogênio, a rapidez deste crescimento, assim como ajuda na formação e estabilização de proteínas

excretadas, como as enzimas. Já o ágar é um polissacarídeo utilizado em meios de cultura sólidos, pois além de ter pouca adesão na alimentação dos microrganismos, não se funde nas temperaturas usualmente empregadas no cultivo, como a gelatina, seu similar, faria (SILVA *et al.*, 2012; SILVA FILHO e VIDOR, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2010; VIEIRA 2012).

O meio BMGU é um meio utilizado para o crescimento rápido da massa celular. Sua composição é: 10 (g/L) de extrato de levedura, 20 (g/L) de peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% de ureia, 4×10^{-5} % de biotina e 1% de glicerol.

Este meio rico em fontes nitrogenadas – extrato de levedura, peptona e ureia - proporciona o crescimento acelerado de micélio. A biotina é uma vitamina amplamente utilizada para enriquecer o meio e ajudar na digestão das fontes de carbono ali presentes, tais como o glicerol, que combinado com o extrato de levedura e da peptona têm forte efeito neste objetivo. O tampão é uma forma de garantir o ambiente ideal para o crescimento da levedura e (BARBOSA e TORRES, 2005; BLACK, 2002; MONTARROYOS, 2007; TABOSA, SOARES e SAAVEDRA, 2009).

2.6 Hidrólise Enzimática do Amido

Os amidos apresentam ampla utilização industrial na sua forma nativa, porém cada vez mais, vêm sendo utilizados após modificações na sua estrutura. Tais modificações podem ser feitas por dois processos: biológicos ou químicos. A hidrólise de amido por processos biológicos, a etapa subsequente à gelatinização é conhecida como liquefação. O processo biológico prevalece frente aos processos químicos por apresentar menor consumo de energia, pouca geração de compostos secundários, simplificação na linha de produção com reatores unitários que são utilizados de forma concomitante tanto para liquefação quanto para a sacarificação e, principalmente, à disponibilidade cada vez maior de enzimas amilolíticas (BARCELOS, 2010).

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

Após a liquefação ocorre a sacarificação, que é a hidrólise total das moléculas em unidades de glicose. Esta reação é catalisada pelas exoamilases, como a glicoamilase, que retira os monômeros de glicose das extremidades não redutoras da

cadeia. O período de tratamento enzimático e a concentração de enzimas para a sacarificação do amido vão depender do tipo de hidrolisado que se pretende obter.

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

Os principais tipos de enzimas envolvidas na hidrólise do amido e as respectivas características estão apresentados na tabela 4. Alguns compostos aromatizantes também se complexam como amido, resultando em redução da percepção, em alimentos amiláceos. Na ligação de alguns compostos ao amido, principalmente à amilose, as moléculas parecem estar complexadas com efeitos competitivos, sinérgicos e antagônicos. Entretanto, a principal razão de todos os polissacarídeos (amidos e gomas alimentícias) reduzirem a percepção de sabores e aromas é a limitação da difusão de moléculas de aroma e sabor para a superfície, devido ao aumento de viscosidade conferido por amidos e gomas (FENEMMA, 2010).

Tabela 4. Enzimas envolvidas na hidrólise do amido

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

Fonte: FENEMMA, 2010.

2.7 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é uma transformação bioquímica de glicídios a etanol onde o CO₂ é eliminado pela célula viva, principalmente por células de leveduras e fungo amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias ou anaeróbias. Esta característica classifica estes microrganismos como facultativos para o oxigênio (XU et al., 2016).

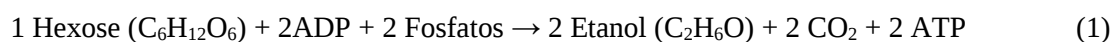
A levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* é industrialmente o principal agente biológico da fermentação alcoólica. Na ausência de oxigênio, esses microrganismos apresentam um desvio da via glicolítica (*Embden-Meyerhof-Parnas*) ao nível do piruvato, descarboxilando-o para formação de acetaldeído que posteriormente é reduzido a etanol. Porém a levedura é capaz de fermentar mesmo em presença de oxigênio, mas o meio precisa de concentrações altíssimas de açúcares fazendo com que ocorra o efeito *Crabtree* onde em alta concentração glicose, há repressão da respiração e a levedura fermenta (HOMMES, 1965; VENTURINI FILHO et al., 2013). O agente biológico mais apropriado para a fermentação alcoólica deve ser selecionado, quando se tenciona transferir o bioprocessos para a escala industrial, em função das seguintes propriedades: elevada atividade, ou seja, ser capaz de converter rapidamente o substrato em produto com altos rendimentos, conduzindo a altos valores de produtividade; estabilidade sob condições ambientais extremas (elevada pressão osmótica do meio, elevada temperatura, elevada força iônica), devendo, ainda, ser tolerante e resistente a substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria prima ou encontradas em resíduos e efluentes (VENTURINI FILHO et al., 2013; MÜLLER, 2008).

Os microrganismos mais indicados para produção de etanol a partir de açúcares são as leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* e a bactéria *Zymomonas mobilis*. No gênero *Saccharomyces* destacam-se as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*) (NELSON & COX 2011) (INGLIS et al 2020).

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

S. cerevisiae é um microrganismo “domesticado” há milhares de anos e seu uso na produção de vinho, cerveja, pão e, mais recentemente, de proteínas heterólogas permitiu a seleção de inúmeras linhagens que geram diferentes subprodutos, que contribuem para o aroma e sabor de bebidas e alimentos, além de apresentarem muitas delas grande produtividade e tolerância ao etanol. A competitividade de *S. cerevisiae* deve-se a uma combinação de muitas propriedades incluindo crescimento rápido, eficiente utilização de glicose e boa habilidade de produzir etanol, bem como alta tolerância à alta concentração de etanol e requerimento de baixos níveis de oxigênio (MÜLLER, 2008; BARCELOS, 2010; VENTURINI FILHO *et al.*, 2013).

Segundo Nelson & Cox (2011) e INGLIS *et al.* (2020) a primeira etapa da fermentação alcoólica, uma vez efetuada a entrada de D-glicose ou de D-frutose na célula, é a fosforilação do açúcar. As enzimas hexoquinase fosforilam estes açúcares, porém com rendimentos diferentes (razão de 3:1 em favor da D-glicose) enquanto que a glucoquinase fosforila exclusivamente a D-glicose. Estas diferenças explicam porque a D-glucose é consumida a uma velocidade maior que a D-frutose no decorrer da fermentação, e como consequência, ao final da fermentação, a concentração relativa da D-frutose é mais elevada que a da D-glicose. O mecanismo metabólico dos açúcares fosforilados é baseado na sua transformação em piruvato através da via clássica da glicólise. O piruvato está principalmente orientado à produção de etanol para regenerar o cofator NAD^+ consumido ao nível de gliceraldeído-3-fosfato. O piruvato é então descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, depois este é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. O balanço global da fermentação alcoólica é dado pela equação (1) da conversão estequiométrica da molécula de glicose em etanol e anidrido carbônico



Durante a fermentação alcoólica também são produzidos outros metabólitos fermentativos e biomassas. Nesta condição, a produção de células é sempre pequena quando comparada com a quantidade de açúcares convertidos em etanol e gás carbônico. Quando o meio é inoculado com uma levedura, a produção de etanol não é imediata. Certas enzimas essenciais na fermentação alcoólica (piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase I) são induzidas pela D-glicose e não estão em seus níveis máximos no princípio da fermentação alcoólica. Em consequência, alguns compostos

além do etanol são formados no começo da fermentação (glicerol, piruvato, succinato e outros ácidos orgânicos). A síntese dos elementos carbonados (aminoácidos e açúcares) necessários na formação de biomassa se dá a partir do metabolismo das hexoses e não conduz à formação de etanol (XU *et al.*, 2016).

2.8 Produção de etanol no Brasil

2.8.1 Uso e Produção de Etanol no Brasil

O etanol, é amplamente aplicado na indústria química, produção de bebidas e também como carburante, é hoje uma das principais bioenergias utilizadas no mundo. Os maiores fabricantes e consumidores do etanol são o Brasil e os Estados Unidos. Tendo em consideração o álcool combustível (bioetanol) e a cogeração de eletricidade advinda do bagaço da cana-de-açúcar, esta se apresenta como a segunda maior fonte de energia renovável do Brasil tendo participação de 12,6% na matriz energética do país (JARDINE, 2009)

O custo de produção e o valor de venda do bioetanol depende da matéria-prima que o mesmo é produzido que deve conter quantidade significativa de carboidratos, geralmente trata-se de amido ou açúcares como sacarose, glicose, frutose e maltose.

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

De acordo com os diversos autores já citados nesta pesquisa, o interesse em biocombustíveis varia entre os países e a época em que se vive. Os fatores que mais influenciam esses interesses podem ser discutidos como: segurança e suprimento, diminuição da dependência por petróleo externo, impactação na balança de pagamentos, minimizar efeitos de poluentes atmosféricos durante as emissões a partir de veículos especialmente, nas grandes cidades, controlar e monitorar os danos ocasionados pela

concentração de gases do efeito estufa na atmosfera. Além da reafirmação de que uma infinidade de combustíveis que podem ser produzidos com biomassa, tais como biodiesel, diesel, metanol, etanol, hidrogênio e metano.

2.8.2 Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL)

Na década de 1970 o Governo Federal tomou uma série de decisões políticas para enfrentar a Crise do Petróleo que se configurava em nível mundial, representava um alto custo nas importações do País, além de representar um colapso na energia consumida no Brasil de modo geral. Dessa forma, em 1975 instituiu o PROÁLCOOL (Programa Nacional do Álcool) que visava basicamente substituir a gasolina, fazendo com que a produção de cana-de-açúcar e álcool no Brasil entre 1975 e 1985 quadruplicasse e, isso fez com que o etanol se tornasse o mais importante combustível.

De acordo com os estudos de Moreira & Goldenberg (1999) várias decisões políticas e econômicas envolviam incentivos à produção de cana-de-açúcar em larga escala visando a produção de álcool combustível e açúcar – no caso do açúcar o preço decaía, ficando atrativo produzir para a indústria do álcool combustível. Ao mesmo tempo em que incentivam a produção de automóveis que funcionassem à base de álcool combustível (etanol).

Segundo Goldenberg *et al.* (2004) este programa passou a se desenvolver em três fases, onde o álcool combustível seria introduzido aos poucos no mercado: **1)** ser usado como aditivo à gasolina na proporção de uma parte de álcool para quatro partes de gasolina, para movimentar veículos de pequeno porte; **2)** num segundo momento, com a mudança dos motores para absorver o álcool produzido, esperava-se que a frota de pequenos veículos fosse plenamente atendida por este combustível alternativo; **3)** na terceira etapa, mais ou menos por meados dos anos 80, o Programa mostrava-se completo com a plena produção não só de álcool e açúcar, mas com perspectiva de explorar ao máximo os subprodutos que eram gerados durante o processo de produção do álcool.

Em sua primeira década o Proálcool apresentou resultados positivos. Automóveis movidos a álcool eram preferência entre os consumidores, a ponto de em 1983, as vendas desses veículos dominarem o mercado brasileiro, sendo que em 1991

essa fonte de energia já movia aproximadamente 60% dos carros do país (cerca de 6 milhões de automóveis).

Apesar de substituir em parte o petróleo, o Programa Nacional do Álcool carrou uma série de problemas sociais e econômicos: elevação da dívida pública pelos benefícios fiscais concedidos às empresas; aumento dos latifúndios monocultores de cana-de-açúcar; elevação dos preços de alguns gêneros alimentícios (pois ocorreu a redução do cultivo de alimentos em substituição à cana-de-açúcar), entre outros.

O PROÁLCOOL mostrava excelência e auto-suficiência, mas dependia de investimentos que advinham também do Petróleo cujos preços continuavam em baixa, fazendo com que o Programa tivesse dificuldades por vários anos. Assim, a terceira etapa do programa foi abandonada pelo governo (PEREIRA JR, 2012).

De acordo com os estudos de Tosta (2004) a produção de etanol no Brasil por meio de processos fermentativos não era significativa antes do PROÁLCOOL, mas que durante o Programa chegou a bater a faixa de 600 milhões de litros por safra.

No Brasil, apesar da dinâmica ascendente que sustentava o consumo e a oferta carburante, esta situação se mantinha sob pressão pela competição dos preços oscilantes do petróleo no mercado internacional e, pela *commoditie* do açúcar que sempre foi atraente para os produtores.

Este quadro econômico culminou com a estagnação do programa na década de 90, favorecendo uma marcante diminuição da frota de carros que eram movidos 100% a álcool, o que desarticulou de forma impactante o modelo em sua conjuntura, que exigia um complexo sistema de regulamentação para que o etanol fosse estocado, o que as empresas não conseguiram atender, comprometendo a oferta do produto no mercado. (NEGRÃO & URBAN, 2005).

Conforme expõe Campos (2003), a década de 90 ficou marcada pela instalação de plantas em escala industrial para a produção de bicomcombustível, visando o alto consumo que fora estimulado.

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

2.8.3 Programa RenovaBio

Em 2017, o Governo Federal visando reativar a Política Nacional de Biocombustíveis no Brasil, criou o RenovaBio, que é a nova Política, instituída pela Lei nº 13.578/2017.

Esta Política buscará se basear na previsibilidade, na sustentabilidade ambiental, econômica e social para expandir a produção de biocombustível no Brasil com vistas a alcançar e expandir o mercado desse produto, a fim de reduzir as emissões de gases de efeito estufa no País.

Para alcançar seus objetivos buscará ampliar seu canal de diálogo com a iniciativa privada, desenvolvendo quatro eixos estratégicos: 1) discutir o papel dos biocombustíveis na matriz energética; 2) gerar desenvolvimento baseado nas sustentabilidades ambiental, econômica e financeira; 3) criar regras de comercialização e, 4) estar atento aos novos biocombustíveis que possam ser desenvolvidos.

O RenovaBio busca ampliar a participação dos combustíveis renováveis de forma compatível com o crescimento do mercado, de forma a buscar permanentemente inovação e coexistência harmônica e de livre concorrência com combustível fóssil existente, agregando valor à biomassa brasileira. Trata-se de um programa que visa estruturar e consolidar uma visão estratégica de Estado para os biocombustíveis.

O RenovaBio terá um importante papel para o COP 21, onde o Ministério de Minas e Energia (MME) é que avaliará e controlará as políticas públicas para a redução dos gases de efeito estufa, dessa forma visa ampliar em 18% a participação de biocombustíveis na matriz energética até 2030, conforme compromisso do Brasil no Acordo de Paris, buscando ainda, reduzir as taxas de emissões de CO₂ dos combustíveis usados no Brasil.

Com desafios desse porte a RenovaBio traz em seu bojo regulamentações que incentivam a eficiência dos biocombustíveis, mas não dá preferência a biocombustíveis específicos, preferindo induzir o consumo de biocombustíveis que sejam mais eficientes em termos energéticos e ambientais, independentemente da proveniência, mas que sejam certificados pelo programa entre eles o etanol, biodiesel, bioquerosene e biometano, sabendo-se que um biocombustível pode ter níveis de eficiência diferentes, dependendo de como foi produzido, distribuído e consumido.

Sempre com foco no mercado, pretende gerar 1,4 milhão de empregos até 2030 na área de construção civil e nas operações das novas capacidades produtivas do setor.

Dessa forma, sob estas perspectivas, espera-se que a economia com importações de derivados seja de 6 bilhões de reais até 2030 (caindo de 11 bilhões de reais para 5 bilhões de reais). Isso não elimina as importações, mas reduzem significativamente a dependência.

Ressalta-se ainda nos estudos realizados pelo *Global Bioenergy Partnership* (GBEP) para a implantação da política RenovaBio indicam que, caso o Brasil decidisse produzir derivados de petróleo para suprir a demanda interna, a produção de biocombustíveis não expandiria como previsto por motivos de ter que repartir os investimentos entre as duas iniciativas, além de gerar apenas 180 mil empregos no mesmo período, ou seja, até 2030.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Otimizar a produção de amilases recombinantes para hidrólise de amido de mandioca visando a produção de etanol.

3.2 Específicos

1. Otimizar o meio de cultivo para produção das amilases recombinantes em fermentação submersa em frascos agitados para obtenção de maiores atividades enzimática;
2. Produzir amilases no meio otimizado em volumes de semi-escalonamento;
3. Analisar a utilização do caldo enzimático concentrado na hidrólise de amido de mandioca por Delineamento Composto Central Rotacional;
4. Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado aplicando diferentes tamanhos de inóculos em fermentômetros para obtenção de álcool; utilizando *Saccharomyces cerevisiae*;
5. Determinar os processos fermentativos em termos de rendimento em produto ($Y^{P/S}$) e produtividade (Q^P);
6. Avaliar a estabilidade de atividade em condições de estoque das enzimas aplicadas no processo de liquefação, sacarificação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Otimização do meio de cultivo para produção das amilases recombinantes

4.1.1 Microrganismos

As enzimas recombinantes, α -amilase e glicoamilase, utilizadas neste trabalho para hidrólise de amido, são resultantes do projeto “Melhoramento da produção de amilases para conversão de substratos em álcool” (Projeto N° 4600230099 – PETROBRAS).

Como material de trabalho, se utilizou uma linhagem de levedura *Pichia pastoris* produtora de glicoamilase desenvolvida no trabalho de Carmo (2010) e um vetor de expressão pPIC9/ α -amy para transformação de levedura, desenvolvido por Astolpho (2012)

Carmo (2010), avaliou o sistema de expressão heteróloga utilizando a levedura *Pichia pastoris* para a produção da enzima glicoamilase, onde o cDNA da glicoamilase isolado do fungo *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1, foi inserido no genoma de *P. pastoris* utilizando o vetor de expressão e secreção pPI-3C9, baseado no promotor AOX, gerando clones recombinantes cultivados sob agitação constante para a produção e secreção da proteína. Os clones secretaram glicoamilase com atividade enzimática 7,7 U/mL, com massa molecular de 116 kDa, temperatura de atividade ótima a 60 °C, elevada ação catalítica em pH ácido de 4.5 e estabilidade frente ao pH do meio reacional, possuindo, portanto, características desejáveis para uso em alguns processos bioindustriais.

Enquanto Astolpho (2012) construiu o vetor de expressão da α -amilase de *Bacillus licheniformis* em levedura *Pichia pastoris*. A região estrutural do gene da enzima α -amilase foi isolada por PCR do vetor pHT-Amy e fusionada à sequência do peptídeo sinal do vetor pPIC9 para transformação de levedura, produção e secreção da α -amilase recombinante. Para a realização deste trabalho, este vetor recombinante foi inserido na levedura *P. pastoris* GS115 por eletroporação e clones recombinantes foram selecionados em meio seletivo contendo amido, analisando a função de α -amilase de hidrolisar o substrato e formar halos translúcidos em placas reveladas com vapor de iodo ressublimado.

Ambos levedura e vetor recombinantes encontram-se criopreservadas sob refrigeração em ultra freezer -80 °C.

4.1.2 Meios de manutenção e cultivos da levedura *P. pastoris*

A manutenção das leveduras, depois de identificadas no estoque e selecionadas, foi realizada por semeadura em placas de *Petri* contendo Meio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose Medium*) (tabela 5) sendo os mesmos renovados a cada 15 dias para que as células se mantivessem sempre novas.

Tabela 5: Composição do Meio YPD para manutenção da linhagem das leveduras em placas de *Petri* e meio líquido

Componentes	Quantidade	Unidade
Extrato de Levedura	10	g/L
Peptona	20	g/L
Glicose	20	g/L
Ágar	20	g/L

Em todos os ensaios de otimização do Meio Padrão estabelecido pela *Invitrogen* (*Pichia Expression Kit: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in Pichia pastoris* - Catalog no. K1710-01), o preparo do inóculo de cada experimento deu-se com a reativação dos microrganismos, no qual uma colônia com auxílio de uma alça de platina, autoclavada e flambada, foi transferida para *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 25 mL de Meio YPD, sem a adição de ágar, e levou-se a incubação por 24 horas sob agitação em *shaker New Brunswick scientific innova 43*, com rotação de 200 rpm a temperatura de 30 °C, para o crescimento das células. Após esse período o meio (25 mL) foi transferido para *Erlenmeyer* de capacidade para 1000 mL contendo 200 mL de Meio Complexo Tamponado com Glicerol BMGU (*Buffered Glycerol Complex Medium*) (tabela 6) e levado a incubação nas mesmas condições previstas por 48 horas para o aumento de massa celular.

Tabela 6: Composição do meio para aumento de massa celular

Componentes	Quantidade	Unidade
Extrato de Levedura	10,00	g/L
Peptona	20,00	g/L
Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0	10,00	mM
Ureia	1,34	%
Biotina	4,00e ⁻⁵	%
Glicerol	1,00	%

Em seguida, o meio contendo a massa das células produzidas foi submetido a centrifugação, a baixa temperatura, em tubos tipo *Falcon*, nas condições de 4000 rpm, por 15 minutos a uma temperatura de 4 °C, descartou-se o sobrenadante e, as células foram ressuspensas com água destilada estéril e reservadas para serem inoculadas nos frascos experimentais.

Os frascos onde ocorreram os experimentos dos delineamentos, foram preparados de acordo com a tabela gerada pelos programas *Statistica 10.0*, pois cada um deles apresentava determinada concentração de cada variável, que foi estudada e que compõem o Meio Complexo tamponado com metanol – BMMU (*Buffered Methanol Complex Medium*) (tabela 7) para a indução da expressão da proteína heteróloga, com os frascos preparados, aquelas células reservadas, foram inoculadas num volume de 1 mL/frasco de pré-inóculo, iniciando o cultivo em OD_{600nm} de 1. E assim, foram levados à incubação por 72 horas sob agitação em *shaker New Brunswick scientific innova 43* com rotação de 200 rpm, a uma temperatura de 30 °C, a cada 24 horas era adicionado a cada sistema o volume tabelado de metanol, para a indução da expressão, assim como era retirada uma alíquota de cada frasco para observação do crescimento celular e atividade de forma a acompanhar o andamento do processo.

Tabela 7: Composição do Meio Padrão da *Invitrogen* estabelecido para indução da expressão das proteínas heterólogas

Componentes	Quantidade	Unidade
Extrato de Levedura	10,00	g/L
Peptona	20,00	g/L
Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0	10,00	mM
Ureia	1,34	%
Biotina	4,00e ⁻⁵	%
Metanol	0,50	%

Em todas as etapas os frascos contendo os meios passaram por processo de esterilização por calor úmido, na forma de vapor saturado sob pressão, em autoclave, por 15 minutos, 1 atm a 110 °C.

A ureia utilizada para composição dos meios foi preparada em solução estoque, numa concentração de 10X, onde foi pesado 67 g de ureia, a mesma foi diluída em *Becker* de vidro e, em balão volumétrico de 1000 mL adicionou-se água destilada autoclavada, em quantidade suficiente até esse volume. Após a homogeneização a solução foi submetida a esterilização num sistema de microfiltração, contendo membrana de 0,22 µm da marca *Millipore* sendo a solução estocada sob refrigeração a 4 °C.

O preparo do tampão fosfato de potássio deu-se pelo cálculo utilizando pKa dos compostos fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4). Com os valores calculados, pesou-se as massas necessárias, diluiu-se em primeiramente 500 mL de água destilada, o pH foi aferido para confirmar o valor de 6,0, transferiu-se para um balão volumétrico com capacidade para 1000 mL e avolumou-se, a solução foi envasada em frasco âmbar e submetido a esterilização, por autoclavação nas condições relatadas acima.

4.1.3 Otimização do meio de cultivo

Em procedimentos fermentativos contendo mais de uma variável, possivelmente cada uma delas age, de certa forma independente, ou interagindo entre elas e com isso apresentar influência direta ou indireta no efeito de outras variáveis, por isso, deve-se utilizar um método de otimização que possa identificar essas possíveis interações, a fim de que um ponto ótimo seja revelado, dentro das condições experimentais estudadas e previstas, assim como também das análises estatísticas dos dados, sem deixar de observar que essas análises devem ser feitas levando em consideração o tipo de planejamento realizado.

O meio padrão apresentava 6 componentes em sua composição – extrato de levedura, peptona, ureia, tampão fosfato de potássio, metanol e biotina – por isso, primeiramente foi realizado um planejamento experimental, *Plackett & Burman* (PB), que apresenta a capacidade de lidar com um número expressivo de variáveis – a partir

de 4 - para serem avaliadas, com a finalidade de obter a avaliação da influência conjunta das variáveis em questão. Tendo como resposta estudada a atividade amilolítica das enzimas recombinantes.

Em seguida, foi adotado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) já que o mesmo apresenta informações relativamente razoáveis para determinar efeitos nas variáveis existentes e a partir daí realizar a otimização. Esse tipo de planejamento estatístico estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável foi estudada em 5 diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, 1, $+\alpha$), cada nível possui seu respectivo valor nominal. O parâmetro α adotado foi o ortogonal 1,41421 de modo a se obter um planejamento, no qual a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX *et al.*, 1978).

Os delineamentos PB e DCCR foram analisados utilizando-se *software Statistica* versão 10.0, para a obtenção da regressão dos dados experimentais e os pontos de maximização utilizando um valor de confiabilidade 90%, ou seja, $p = 0,1$.

4.1.3.1 Otimização da produção da glicoamilase

Os níveis para o início e seguimento até a validação da otimização do meio padrão para a glicoamilase estão mensurados nas tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

Os parâmetros utilizados para escolha dos níveis iniciais que geraram o primeiro PB, tiveram como base as concentrações do meio padrão indicado pela *Invitrogen* para a levedura *P. pastoris*.

Tabela 8: Níveis do *Plackett & Burman* I utilizada para avaliação da influência conjunta das variáveis da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase

Variáveis	Unidades	Níveis		
		Min (-1)	PC (0)	Máx (+1)
Extrato de levedura (X_1)	g/L	2,50	15,00	27,50
Peptona (X_2)	g/L	5,00	30,00	55,00
Ureia (X_3)	g/L	0,34	2,01	3,69
Tampão fosfato (X_4)	M	0,03	0,15	0,28
Metanol (X_5)	%	0,13	0,63	1,13
Biotina (X_6)	%	2,00	6,00	10,00

Tabela 9: Níveis do *Plackett & Burman* II utilizada para avaliação da possibilidade da retirada dos componentes que apresentaram efeito negativo e não significativo em resposta ao PBI da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase

Variáveis	Unidades	Níveis		
		Min (-1)	PC (0)	Máx (+1)
Extrato de levedura (X ₁)	g/L	0,00	13,75	27,50
Peptona (X ₂)	g/L	0,00	27,50	55,00
Ureia (X ₃)	g/L	0,00	1,85	3,69
Tampão fosfato (X ₄)	M	0,15	0,28	0,41
Metanol (X ₅)	%	0,56	1,13	1,70
Biotina (X ₆)	%	6,00	10,00	14,00

Tabela 10: Níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para validação da otimização do Meio Padrão da enzima glicoamilase

Nome da Variável	Unidades	(-α)	-1	0	1	(+α)
Extrato de levedura (X ₁)	g/L	1,20	7,00	21,00	35,00	40,80
Biotina (X ₂)	%	2,93	5,00	10,00	15,00	17,07

4.1.3.2 Otimização da produção da α -amilase

Os níveis para o início e seguimento até a validação da otimização do Meio Padrão para a α -amilase estão mensurados nas Tabelas 11, 12 e 13, respectivamente.

Os parâmetros utilizados para escolha dos níveis iniciais que geraram o primeiro PB seguiram o mesmo critério da glicoamilase, ou seja, baseado nas concentrações do Meio Padrão indicado pela *Invitrogen* e utilizado nos trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa.

Tabela 11: Níveis do *Plackett & Burman* I utilizada para avaliação da influência conjunta das variáveis da composição Meio Padrão da enzima α -amilase

Variáveis	Unidades	Níveis		
		Min (-1)	PC (0)	Máx (+1)
Extrato de levedura (X ₁)	g/L	2,50	15,00	27,50
Peptona (X ₂)	g/L	5,00	30,00	55,00
Ureia (X ₃)	g/L	0,34	2,01	3,69
Tampão fosfato (X ₄)	M	0,03	0,15	0,28
Metanol (X ₅)	%	0,13	0,63	1,13
Biotina (X ₆)	%	2,00	6,00	10,00

Para a continuação de otimização da α -amilase foi utilizado o Experimento Fatorial Fracionado que dentro dos experimentos industriais são os arranjos mais utilizados, pois nos oferece uma visão mais realista das operações conjuntas do processo já que todos os fatores variam simultaneamente nos dando a oportunidade de obter a variável de resposta de forma clara expondo o estudo de interação existente entre os fatores ao invés de estudarmos cada fator separadamente. A utilização desses experimentos também está relacionada quando se tem um número de fatores relativamente grande e/ou recursos bastante limitados sendo que o fatorial fracionado utiliza menos ensaios experimentais que os fatoriais completos (King, 1995). Assim, foi realizado um delineamento Fatorial Fracionado 2^{6-2} com os níveis que podem ser vistos na tabela 12.

Tabela 12: Níveis do Fatorial Fracionado utilizada para avaliação da possibilidade da retirada dos componentes que apresentaram efeito negativo e não significativo em resposta ao PBI da composição Meio Padrão da enzima α -amilase

Variáveis	Unidades	Níveis		
		Min (-1)	PC (0)	Máx (+1)
Extrato de levedura (X_1)	g/L	5,00	27,50	50,00
Peptona (X_2)	g/L	10,00	40,00	70,00
Ureia (X_3)	g/L	0,00	1,85	3,69
Tampão fosfato (X_4)	M	0,03	0,15	0,27
Metanol (X_5)	%	0,13	0,63	1,13
Biotina (X_6)	%	0,00	5,00	10,00

Em seguida passou-se para a metodologia de superfícies de resposta que é composta de duas fases diferentes, sendo elas a modelagem e o deslocamento. Essas fases podem apresentar a necessidade de serem repetidas diversas vezes até que seu objetivo seja atingido, ou seja, que os resultados mostrem uma região ótima seja ela de máxima ou mínima, da superfície investigada. Fazendo os ajustes dos modelos lineares ou quadráticos através dos resultados dos experimentos obtidos a partir de planejamentos fatoriais temos a modelagem. Enquanto que o deslocamento é obtido no decorrer do caminho em busca da máxima inclinação de um determinado modelo. Por isso, a necessidade de prosseguir com os Delineamentos Composto Central para conseguir a otimização desse processo com os níveis apresentados nas tabelas 13 e 14 para continuidade.

Tabela 13: Níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I) para otimização do Meio Padrão da enzima α -amilase

Nome da Variável	Unidades	(- α)	-1	0	1	(+ α)
Extrato de levedura (X_1)	g/L	1,27	4,00	8,00	12,00	14,73
Peptona (X_2)	g/L	16,36	30,00	50,00	70,00	83,64
Tampão Fosfato (X_3)	Mol	0,56	0,70	0,90	1,10	1,24

Tabela 14: Níveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para validação da otimização do Meio Padrão da enzima α -amilase

Nome da Variável	Unidades	(- α)	-1	0	1	(+ α)
Extrato de levedura (X_1)	g/L	12,95	15,00	20,00	25,00	27,05
Tampão Fosfato (X_2)	%	0,62	0,70	0,90	1,10	1,18

4.1.4 Dosagens das atividades enzimáticas

4.1.4.1 Atividade dextrinizante da α -amilase

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

Uma unidade de α -amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto a 40 °C, partindo de 1,0 mg de amido presente no início da reação. Utilizou-se soluções de amido em concentrações variadas

de 0 a 10 mg/mL para a obtenção da curva padrão de degradação do substrato referente a dosagem de α -amilase.

4.1.4.2 Atividade amiloglicosidásica

A determinação quantitativa da atividade sacarificante da glicoamilase foi realizada após a obtenção dos sobrenadantes da fase de indução utilizando o método DNS descrito por Miller (1959). Este reagente é composto por ácido 3,5 dinitro-salicílico, sal de Rochelle, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio. O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração escura. Foi adicionado a 60 μ L do sobrenadante da enzima, 140 μ L de solução de amido solúvel 1,0% (Merck) confeccionado com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, seguido de incubação a 60 °C por 30 minutos, posteriormente, foi adicionado 1500 μ L do reagente DNS, para que a reação fosse interrompida. A mistura foi levada a banho fervente por 5 minutos proporcionando a formação de coloração, em seguida foi rapidamente resfriada em banho de gelo e o volume completado para 10,0 mL com água destilada. Com material homogeneizado fez-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O branco para a reação foi feito com a adição de 200 μ L de solução de amido solúvel 1,0% (Merck) confeccionado com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, 1500 μ L do reagente DNS e 8,3 mL de água destilada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os valores das absorbâncias foram utilizados para medir a atividade da enzima nos ensaios. A curva padrão para o cálculo enzimático utilizou concentrações de glicose que variaram de 0,1 a 3,0 mg/mL.

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

4.2 Produção das amilases em frascos agitados em meio de cultura otimizado

O meio de produção das enzimas recombinantes dessa etapa do processo, procedeu-se de acordo com o especificado, após a otimização do meio padrão, como

pode ser visto nas tabelas 15 e 16. Com os parâmetros otimizados a produção das amilases foi realizada em frascos agitados com volumes nominais de 500 e 1000 mL e volumes úteis de 160 e 300 mL, respectivamente, caracterizando um processo de semi-escalonamento. Os frascos foram levados à incubação por 72 horas sob agitação em shaker *New Brunswick scientific innova 43* com rotação de 200 rpm, a uma temperatura de 30 °C, a cada 24 horas fora adicionado ao sistema o volume otimizado de metanol, para a indução da expressão e formação do produto, uma alíquota de cada frasco foi retirada para observação do crescimento celular e atividade de forma a acompanhar o andamento do processo. As condições de contorno de rotação, temperatura e tempo de incubação foram otimizados pelo grupo de pesquisa.

Tabela 15: Valores das concentrações do meio otimizado da enzima α -amilase

Componentes	Unidades	Valor otimizado
Extrato de levedura (X ₁)	g/L	22,06
Peptona (X ₂)	g/L	70,00
Ureia (X ₃)	g/L	0,00
Tampão fosfato (X ₄)	M	1,06
Metanol (X ₅)	%	0,13
Biotina (X ₆)	%	2,00

Tabela 16: Valores das concentrações do meio otimizado da enzima glicoamilase

Componentes	Unidades	Valor otimizado
Extrato de levedura (X ₁)	g/L	23,22
Peptona (X ₂)	g/L	0,00
Ureia (X ₃)	g/L	0,00
Tampão fosfato (X ₄)	M	0,15
Metanol (X ₅)	%	0,63
Biotina (X ₆)	%	21,24

4.3 Concentração do caldo enzimático

4.3.1 Concentração por ultrafiltração tangencial em sistema de membranas de fibras ocas

Após a produção das bateladas em frascos agitados, o meio fermentado passou por centrifugação refrigerada, em frascos de 400 mL, numa rotação de 4000 rpm a uma temperatura de 4 °C por 30 minutos, para a retirada de células do meio líquido. O sobrenadante foi reservado sob refrigeração de 8 °C $\pm$ 3 e passou por filtração à vácuo,

ao sistema foi acoplado membrana de 1,2 μm de poro, 47 mm de diâmetro (figura 9). Sendo o complexo enzimático levado a concentração por ultrafiltração tangencial, em membranas de fibras ocas.



Figura 9. Volume final da produção de α -amilase com meio otimizado (A); Volume final da produção de glucoamilase (B); Sistema de filtração à vácuo (C)

O caldo enzimático amilásico foi concentrado em um sistema de filtração tangencial em membrana de fibras ocas de polissulfona, *Hollow Fiber* modelo *QuixStand*, marca *GE Healthcare*.

A primeira etapa da concentração deu-se por microfiltração, que se consistiu em passar o complexo em membranas de 0,2 μm mostrado na figura 10 A e B, para a retirada de células remanescentes e/ou material particulado que, por ventura, estivesse presente no meio mesmo após a filtração à vácuo.

Com o caldo devidamente filtrado, o mesmo foi levado a concentração em cartucho com membrana de corte (*cut-off*) de 30 kDa mostrado na figura 10 C e D, a uma pressão que pode variar de 10 – 15 *psi* na entrada do cartucho sendo o processo realizado a temperatura ambiente. Foram coletadas amostras do tanque de alimentação (caldo bruto), do permeado da ultrafiltração e do concentrado final, para quantificação das respectivas atividades amilolíticas.



Figura 10. Sistema de microfiltração em membranas de $0,2\ \mu\text{m}$ para a retirada de células e/ou material particulado (A e B); Sistema de concentração em cartucho com membrana de corte (*cut-off*) de 30 kDa (C e D)

4.4 Avaliação da utilização do caldo enzimático concentrado na hidrólise de amido de mandioca

4.4.1 Quantificação do Teor de Amido na Fécula de Mandioca

A fécula utilizada neste trabalho, foi adquirida no mercado da cidade de Manaus em saco de 25 kg da Fecularia Loanda LTDA do Estado do Paraná.

O teor de amido na fécula de mandioca foi determinado através da quantificação de glicose liberada na hidrólise enzimática, utilizando α -amilase (*Thermamyl*) e glicoamilase (AMG 300) comercial da NOVOZYMES. Secou-se a fécula de mandioca, em estufa a 100 °C por um período de aproximadamente 7 horas até que a massa não apresentasse mais variação quando aferido, e ressuspendeu-a em água a fim de se obter uma concentração final de 2,0% (m/v). Ajustado o pH para 6,0, quando se fez necessário, com adição de NaOH 2 M e adicionou-se uma carga de α -amilase de 1 mL/g de fécula. Aqueceu-se a mistura a 90 °C durante 2 h. Decorrido o tempo reacional, a temperatura do sistema foi reduzida para 60 °C e o pH ajustado para 4,5 com H₂SO₄ 7,5% (v/v), quando necessário. Acrescentou-se uma carga de glicoamilase de 1 mL/g de fécula e manteve-se a temperatura de 60 °C por 24 h. Quantificou-se a glicose presente no sobrenadante pelo método enzimático de glicose oxidase (GOD). Foi realizado paralelamente duas determinações nas mesmas condições descritas acima, a fim de se quantificar a glicose livre presente na mistura água-amido, sem adição de enzimas (branco) e a glicose presente nos preparados enzimáticos (controle). A concentração de glicose tanto no branco como no controle, foram subtraídas da amostra hidrolisada para que estes não interfiram nos cálculos para quantificação do teor de amido presente na fécula de mandioca. O teor de amido foi calculado como descrito abaixo:

$$\text{Amido}_{\text{pesoseco}} (\%) = \frac{(GT - GR) \times V_T \times 100}{MSG \times 1,11} \quad (3)$$

Onde,

GT: concentração de glicose total (g.L⁻¹);

GR: concentração de glicose residual (branco e controles) (g.L⁻¹);

V_T: volume total (L);

MSG: massa seca de fécula (g).

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

4.4.2 Estudo da Hidrólise Enzimática

4.4.2.1 Estudo das cargas enzimáticas na hidrólise do amido da Fécula de Mandioca

Para a avaliação e otimização das condições de hidrólise do amido da fécula de mandioca quanto a proporção das amilases (variáveis), utilizou-se o Delineamento Experimental de mixtura *simplex-centroid*, onde foi gerada uma matriz com 10 experimentos. Foram adotadas cargas enzimáticas limites de mínimo e máximo de 8,99 e 91,01 $\mu\text{L/g}$ de fécula para α -amilase e, 59,12 e 194,88 $\mu\text{L/g}$ para a glicoamilase, respectivamente, de acordo com a tabela 17. Sendo a concentração de glicose (g/L) variável dependente dessa análise. A hidrólise foi realizada em tubos de ensaio num volume de 10 mL com a concentração de 20% de fécula de mandioca, nas condições reacionais conforme tabela gerada; adotou-se a temperatura de 60 °C, e tempo de hidrólise de 180 minutos com o sistema contendo as duas enzimas, antes de serem adicionadas o meio passou por um período de 30 minutos de gelatinização a 90 °C para haver uma desorganização na estrutura do amido e assim as enzimas pudessem atuar com mais eficiência. Os tubos foram agitados, em *shaker* para homogeneização do sistema. Decorrido o tempo reacional, as amostras passaram por centrifugação com rotação de 4000 rpm por 10 minutos e, a glicose, como produto final, foi quantificada pelo método de glicose oxidase (GOD).

Tabela 17: Níveis do Delineamento experimental de mixtura *simplex-centroid* para o estudo das cargas enzimáticas na hidrólise do amido de fécula de mandioca para condição ideal de hidrólise

Nome da Variável	Unidades	(- α)	-1	0	1	(+ α)
Alfa (X_1)	$\mu\text{L/g}$	8,99	21,00	50,00	79,00	91,01
Glico (X_2)	$\mu\text{L/g}$	59,12	79,00	127,00	175,00	194,88

Um fluxograma do processo da hidrólise enzimática pode ser observado na figura 11.

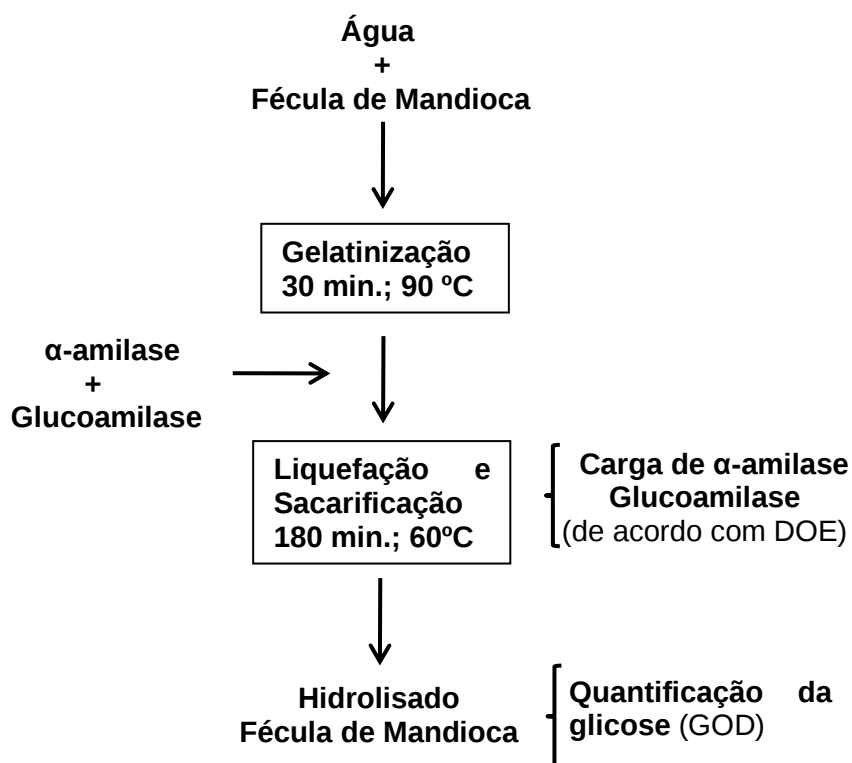


Figura 11. Fluxograma representativo do processo de estudo da hidrólise enzimática da fécula de mandioca.

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

$$EH (\%) = \frac{ARL}{ARO \times 1,11} \times 100 \quad (4)$$

Onde,

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

ARL: concentração de açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática de fécula de mandioca (g.L⁻¹);

ARO: concentração de açúcares redutores que poderiam ser obtidos de fécula de mandioca com eficiência de 100% (g.L⁻¹).

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

A resposta apontada como ideal pela análise do programa foi levada para realização da validação, ocorrendo em erlenmeyer de 250 mL sendo o volume de meio reacional de 25 mL nas condições de contorno citadas anteriormente.

4.4.2.2 Quantificação de glicose pelo método glicose oxidase (GOD)

Em tubos de ensaio, adicionou-se 10 μL de amostra obtidas através dos processos de hidrólise, assim como, o de fermentação, 1 mL de reagente enzimático de glicose oxidase (GOD) a solução foi levada a aquecimento em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Resfriou-se e adicionou-se 1 mL de água. O sistema foi homogeneizado e realizou-se a leitura em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 505 nm. O preparo da amostra padrão e do branco foram realizadas nas mesmas condições, substituindo a amostra pelo padrão e água destilada, respectivamente. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. A concentração de glicose presente na amostra foi calculada como descrito na Equação 2:

$$\text{Glicose (g/L)} = \frac{\text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância padrão}} \times \text{Diluição} \quad (2)$$

4.4.2.3 Estudo da otimização da proporção sólido:líquido para hidrólise do amido da Fécula de Mandioca pela mistura enzimática otimizada

Com a mistura das amilases definida passamos ao estudo da hidrólise e, para que a mesma se tornasse efetivamente eficiente a proporção de fécula de mandioca em g/L e a proporção de mistura das amilases em U/mL fosse ajustada, foi utilizado o planejamento experimental DCCR, seguido de validação. Na tabela 18 apresenta-se os níveis estudados neste delineamento, a matriz experimental foi composta de 11 ensaios, sendo 3 repetições no ponto central, tendo como parâmetro para o ponto central a proporção utilizada na literatura de 20% (m:v). Para os ensaios da matriz, o *blend* enzimático otimizado na etapa anterior, foi incubado juntamente com o substrato de

fécua de mandioca dentro das proporções indicadas pela matriz em tubos de ensaio sob agitação de 200 rpm a temperatura de 60 °C por um período de 48 horas. Sendo a produção de glicose (g/L) dosada pelo método de GOD e a Eficiência Hidrolítica (%) foram determinadas com as variáveis de resposta analisadas pelo programa.

Tabela 18: Fatores e níveis do DCCR para otimização do carregamento sólido:líquido

Fatores	(- α)	-1	0	1	(+ α)
Substrato sólido (g/L)	12,93	15,00	20,00	25,00	27,07
Volume de mix (μ L/g)	258,58	300,00	400,00	500,00	541,42

Com as respostas das análises chegou-se a um novo planejamento como mostra a tabela 19 com níveis ajustados onde os valores do nível máximo (+ α) passou a ocupar o ponto de nível médio (0) fazendo com que os valores tivessem em nível máximo o dobro dos valores utilizados no delineamento anterior conforme a necessidade mostrada pelos resultados do DCCR I para a otimização da proporção sólido:líquido observando-se as condições de contorno adotadas anteriormente.

Tabela 19: Fatores e níveis do DCCR II para otimização do carregamento sólido:líquido

Fatores	(- α)	-1	0	1	(+ α)
Substrato sólido (g/L)	1,72	10,00	30,00	50,00	58,28
Volume de mix (μ L/g)	34,31	200,00	600,00	1000,00	1165,69

Com os novos resultados observou-se a necessidade de um novo ajuste nos níveis e foi gerado um novo delineamento (DCCR III) utilizando os valores preditos pelo programa sendo eles 4,222926 para concentração do sólido (fécua de mandioca) e 3,415573 para o volume do *blend* (mistura das amilases), sendo esses valores codificados. Transformando-os em valores reais fez-se a tabela 20 onde o nível do ponto médio (0) do delineamento anterior foi deslocado para o nível mínimo (- α) fazendo com que os novos níveis pudessem chegar a uma hidrólise satisfatória liquefazendo e também obtendo o aumento da concentração final de glicose no mosto e levado à validação.

Tabela 20: Fatores e níveis do DCCR III para otimização do carregamento sólido:líquido

Fatores	(- α)	-1	0	1	(+ α)
Substrato sólido (g/L)	30,00	38,70	60,00	81,30	90,00
Volume de mix (U/g)	600,00	774,50	1200,00	1625,50	1800,00

4.4.3 Hidrólise de Fécula de Mandioca

Com a condição de hidrólise enzimática determinada na etapa anterior, foi realizada a hidrólise de 400 mL de mosto. Onde foi pesado 183,24 g de fécula de mandioca que foi diluído em 290 mL de água destilada, a solução foi levada a gelatinização a 90 °C por 30 minutos, após esse período o sistema foi levado a arrefecimento para que chegasse a uma temperatura de aproximadamente 60 °C e assim adicionar um volume de 3,5 mL da mistura de enzimas nas concentrações de 10,15 $\mu\text{L/g}$ (5897,40 U) de α -amilase e 9,00 $\mu\text{L/g}$ (61,89 U) de glicoamilase, e realizou-se a hidrólise por 48 horas em *shaker* numa rotação de 200 rpm a 60 °C. Após o processo de liquefação e sacarificação simultânea uma alíquota de 1 mL foi coletada para quantificação da concentração de glicose, no meio fermentativo, pelo método de GOD.

Durante o preparo do hidrolisado, alíquotas de 0,5 mL foram coletadas das amostras a cada 2 horas para determinar a concentração de glicose pelo método GOD, para a construção do perfil cinético da hidrólise enzimática.

Após a sacarificação o meio hidrolisado foi autoclavado por 15 minutos numa pressão de 1,0 atm e 121 °C para posterior fermentação.

4.5 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado em fermentômetros para obtenção de álcool utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

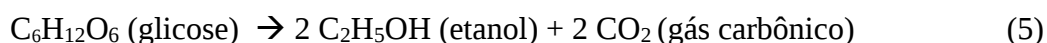
4.5.1 Meio de fermentação da levedura *Sacharomyces cerevisiae*

O meio fermentativo para *Saccharomyces cerevisiae* foi composto de: 1,25 g/L de ureia, 1,1 g/L KH_2PO_4 , 2,00 g/L de extrato de levedura, e 40,00 mL/L da solução de sais minerais e ácido cítrico. Sendo a composição da solução de sais: 12,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,25 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,5 g/L Ácido cítrico, 0,9 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,19 g/L de MnSO_4 , 0,3 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,025 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025 g/L de

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,035 g/L de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/L de H_3BO_3 , 0,009 g/L de KI e 0,0125 g/L de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

4.5.2 Fermentação submersa do hidrolisado de fécula de mandioca pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentômetros (*airlock*)

Este experimento foi realizado em frascos cônicos, compondo sistemas fechados, com aparelhos construídos em vidro, que facilita a saída do CO_2 sem permitir que haja entrada de ar, chamados de fermentômetros (*airlock*). A realização do processo em fermentômetros possibilita acompanhar a fermentação pela perda de peso do sistema. A perda de peso é decorrente do desprendimento de CO_2 , controlada por um dispositivo que, por diferença de pressão e uma coluna de água, direciona a passagem do CO_2 e minimiza as perdas por evaporação ou por arraste do gás desprendido durante o processo. O monitoramento do CO_2 com o uso de fermentômetros permite estimar, de forma indireta e muito utilizada na prática, a concentração de etanol que foi formado no sistema, considerando o balanço estequiométrico da conversão de glicose a etanol como vemos na equação 5.



Além da evolução de CO_2 , o desempenho da fermentação foi avaliado pelas medidas iniciais e finais das concentrações de substrato e de produto, de forma a possibilitar o cálculo das principais variáveis de resposta processo ($Y_{P/S}$ e Q_P).

Após a autoclavagem do hidrolisado, o sistema passou por resfriamento para a temperatura de até 30 °C e foi retirado uma alíquota para quantificação da concentração de glicose e então foi inoculada a biomassa de *S. cerevisiae* comercial *Saf-instant* uma concentração de inóculo de 15 g/L. Após todos os parâmetros observados e aferidos, foi acoplado o fermentômetro. Logo após a adição da levedura e com o sistema devidamente montado os frascos foram imediatamente pesados e incubados em *shake* à temperatura de 35 °C e 150 rpm.

Em intervalos definidos (inicialmente 30 minutos), houve monitoramento do processo fermentativo, aferindo a massa do sistema. Quando a diferença de massa entre uma medida e outra tornou-se desprezível, as fermentações foram dadas como

encerradas. Ao término do processo, as amostras foram retiradas para determinação de condições finais (concentração de açúcares e etanol). A quantificação de etanol foi realizada por sistema de cromatografia gasosa (CG).

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

a) Produtividade Volumétrica(Q_P):

$$Q_P = \frac{(P - P_0)}{t_F} \quad (6)$$

Onde,

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

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

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

t_F : tempo de fermentação (h).

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

$$EF(\%) = \frac{Y_{P/S}}{ET} \times 100 \quad (7)$$

Onde,

$E.F.$: eficiência de fermentação (%);

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

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

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

$$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} \quad (8)$$

Onde,

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

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

P_0 : concentração inicial de etanol (g.L⁻¹);

S_0 : concentração inicial de glicose (g.L⁻¹);

S : concentração final de glicose (g.L⁻¹).

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

$$RPS(\%) = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \times 100 \quad (9)$$

Onde,

RPS: redução percentual de substrato (%);

S_0 : concentração inicial de glicose (g.L⁻¹);

S : concentração final de glicose (g.L⁻¹).

4.6 Determinação do Teor de Etanol

4.6.1 Análise do álcool

O mosto fermentado foi submetido a centrifugação com rotação de 4000 rpm por 20 minutos a 4 °C em tubos falcons de 50 mL após centrifugação as amostras passaram por filtração em membrana de 0,22 µm da marca *Millipore* sendo a solução estocada em frascos de vidro com tampa de rosca e mantidos sob refrigeração.

As amostras reservadas após a centrifugação foram submetidas a análise no Laboratório de Central de Análises Químicas, da Escola Superior de Tecnologia – EST da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. Para as análises qualitativa e quantitativa do álcool foi utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa (CG) em Cromatógrafo em Fase Gasosa Shimadzu, com detector FID e *Headspace*, coluna SH-Rtx-1(30m x 0,32mm x 0,25mm) Shimadzu com Padrão de Etanol Absoluto: Merck EMSURE –ACS, ISO, Reag. Ph Eur.

A análise qualitativa, com relação ao etanol, foi realizada pela comparação dos tempos de retenção do padrão de etanol com as amostras analisadas, bem como pela técnica de adição de padrão.

A análise quantitativa foi realizada pela técnica de padronização externa do padrão de etanol.

4.7 Avaliação da estabilidade das enzimas concentradas

As enzimas concentradas foram reservadas em refrigeração com temperatura com temperatura de $8 (\pm 3) ^\circ\text{C}$, assim como em temperatura ambiente com temperatura de $22 (\pm 4) ^\circ\text{C}$. Em intervalos regulares de 30 dias foram avaliadas as atividades dextrinizante e sacarificante das mesmas afim de acompanhar a estabilidade de estoque e prateleira das mesmas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do meio de cultivo para produção das amilases recombinantes

Necessariamente para que haja desenvolvimento das tecnologias de produção de quaisquer biomoléculas deve-se utilizar a otimização da composição do meio de cultivo.

A otimização do meio se deu quanto a análise dos componentes do mesmo. Segundo Rocha (2010) para saber se as concentrações desses nutrientes se encontravam em quantidades satisfatórias, se são realmente necessárias, ou até mesmo em concentrações capazes de causar inibições, foi utilizado o método de planejamentos de experimentos sequenciais. Os delineamentos utilizados foram o *Plackett & Burman*, Delineamento Composto Central Rotacional, Fatorial Fracionado, Delineamento Experimental de mistura *simplex-centroid* que visa a seleção de fatores e tem função de intermediar a orientação e encaminhamento para o delineamento final para a validação da otimização.

5.1.1 Otimização da produção da glicoamilase

Realizou-se inicialmente estudos acerca da otimização dos componentes do Meio Padrão de cultivo para a produção da glicoamilase. Na tabela 21 estão apresentados os resultados do delineamento PB-I para glicoamilase. Neste delineamento pode-se verificar que houve efeito dos componentes do meio com atividade variando de 0,550 a 3,93 U/mL de atividade sacarificante. Por meio do Diagrama de Pareto (figura 12) apenas o tampão fosfato apresentou significância. Observando os efeitos (tabela 22) verificou-se o efeito positivo dos componentes tampão fosfato de potássio, metanol e biotina. Os componentes extrato de levedura, peptona, ureia e biotina não apresentaram importância significativa, $p < 0,10$, ao contrário do tampão fosfato que apresentou significância. Diante das análises realizadas foram tomadas as seguintes decisões para realização de um segundo delineamento PB-II, os componentes que apresentaram efeito negativo foram testados em nível mínimo (-1) tendo valor 0 (zero) e mantendo como máximo (+1) o valor da tabela anterior essa decisão foi tomada para verificar se esses componentes poderiam ser retirados do meio. Com exceção da biotina, pois, apesar de não ter apresentado significância, expos um efeito positivo, tendo seus valores de níveis

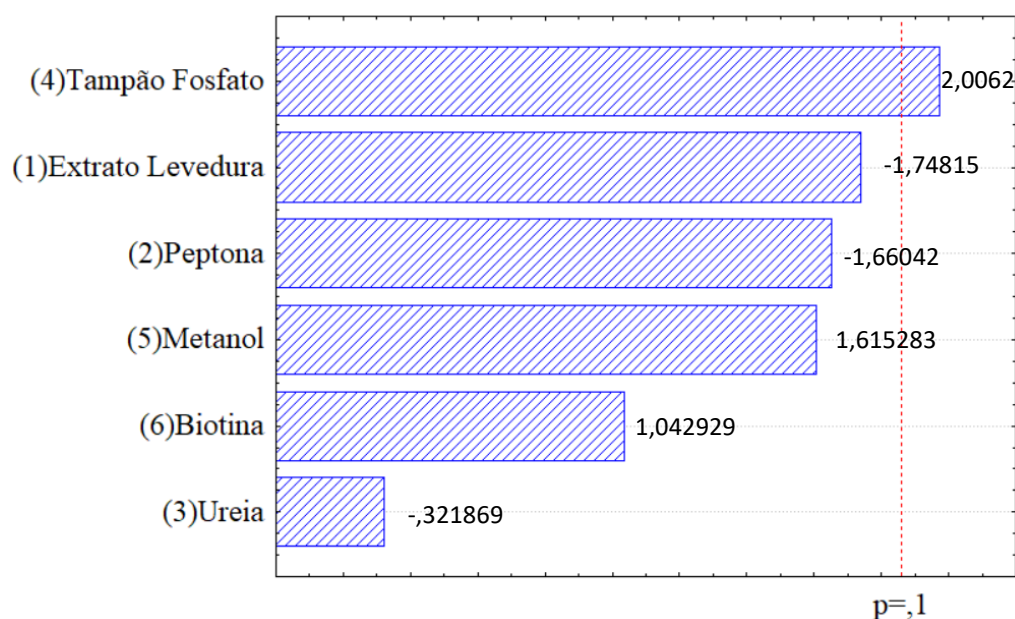


Figura 12: Diagrama de Pareto do delineamento *Plackett & Burman I* utilizada para avaliação da influência das variáveis da composição do Meio Padrão da enzima glicoamilase

Tabela 22: Tabela de efeitos para a resposta do *Plackett & Burman I* da **Os meios de Cultivo** enzima glicoamilase

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	1245,84	186,86	6,67	0,0003
Extrato Levedura (x_1)	-684,15	373,72	-1,83	0,1098
Peptona (x_2)	-649,65	373,72	-1,74	0,1257
Ureia (x_3)	-126,48	373,72	-0,34	0,7450
Tampão Fosfato (x_4)	776,13	373,72	2,08	0,0764
Metanol (x_5)	632,40	373,72	1,69	0,1344
Biotina (x_6)	408,19	373,72	1,09	0,3109

Os resultados do segundo PB-II (Tabela 23) apresentaram um avanço no aumento das atividades enzimáticas, passando de 3,93 U/mL, valor máximo no primeiro experimento, para 6,92 U/mL representando cerca de 76% de aumento no rendimento. Analisando-se os efeitos dos parâmetros, através do Diagrama de Pareto, no segundo experimento (figura 13) verifica-se que o extrato de levedura é o componente mais importante para a atividade para a enzima estudada. Constatou-se, pelo resultado da tabela 24, também que esse componente apresentou efeito positivo, indicando com isso que sua concentração poderia ser aumentada no próximo planejamento o que ocorreu com a biotina. A peptona e ureia não apresentaram, estatisticamente, importância

significativa para a atividade amilolítica da glicoamilase, podendo assim proceder com sua retirada do meio, apontar a remoção da peptona do meio é um resultado bastante satisfatório, pois essa fonte de nitrogênio apresenta um custo alto quando necessária sua utilização. O tampão fosfato quando aumentado seu nível máximo apresentou significância, porém obteve-se efeito negativo, por esse motivo para o subsequente fixou-se sua concentração no nível mínimo (-1), já que esse componente atua no equilíbrio do sistema, supre os fosfatos para o metabolismo da levedura e como apresenta pH 6,0 opera como inibidor das proteases alcalinas.

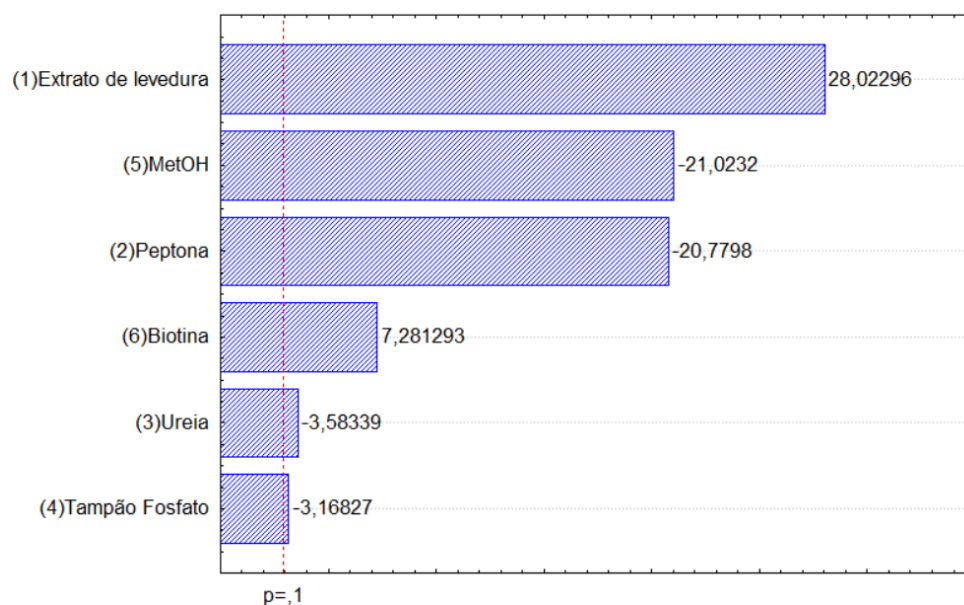


Figura 13: Diagrama de Pareto do delineamento *Plackett & Burman* II utilizada para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase

Tabela 23: Resultado do PBII da enzima glicoamilase para otimização dos componentes do Meio Padrão da enzima glicoamilase

Experimentos	Componentes do meio						Glucose (Y ₁ , (U/mL))
	Extrato de levedura (x ₁)	Peptona (x ₂)	Ureia (x ₃)	Tampão fosfato (x ₄)	Metanol (x ₅)	Biotina (x ₆)	
1	1 (27,50)	-1 (0,00)	1 (3,69)	-1 (0,15)	-1 (0,63)	-1 (2,00)	3,974
2	1 (27,50)	1 (55,00)	-1 (0,00)	1 (0,41)	-1 (0,63)	-1 (2,00)	2,180
3	-1 (0,00)	1 (55,00)	1 (3,69)	-1 (0,15)	1 (1,63)	-1 (2,00)	0,852
4	1 (27,50)	-1 (0,00)	1 (3,69)	1 (0,41)	-1 (0,63)	1 (10,00)	5,974
5	1 (27,50)	1 (55,00)	-1 (0,00)	1 (0,41)	1 (1,63)	-1 (2,00)	3,267
6	1 (27,50)	1 (55,00)	1 (3,69)	-1 (0,15)	1 (1,63)	1 (10,00)	1,024
7	-1 (0,00)	1 (55,00)	1 (3,69)	1 (0,41)	-1 (0,63)	1 (10,00)	3,180
8	-1 (0,00)	-1 (0,00)	1 (3,69)	1 (0,41)	1 (1,63)	-1 (2,00)	0,507
9	-1 (0,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	1 (0,41)	1 (1,63)	1 (10,00)	0,490
10	1 (27,50)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	-1 (0,15)	1 (1,63)	1 (10,00)	5,716
11	-1 (0,00)	1 (55,00)	-1 (0,00)	-1 (0,15)	-1 (0,63)	1 (10,00)	1,404
12	-1 (0,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	-1 (0,15)	-1 (0,63)	-1 (2,00)	3,956
13 (C)	0 (13,75)	0 (27,50)	0 (1,85)	0 (0,28)	0 (1,13)	0 (6,00)	6,923
14 (C)	0 (13,75)	0 (27,50)	0 (1,85)	0 (0,28)	0 (1,13)	0 (6,00)	6,681
15 (C)	0 (13,75)	0 (27,50)	0 (1,85)	0 (0,28)	0 (1,13)	0 (6,00)	6,802
Média							3,529
Desvio-padrão							2,333

Tabela 24: Tabela de efeitos para a resposta do *Plackett & Burman II* da enzima glicoamilase

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	2710,43	34,8522	77,7691	0,000165
Curvatura	8183,88	155,8640	52,5066	0,000363
Extrato Levedura (x ₁)	1957,58	69,7045	28,0840	0,001265
Peptona (x ₂)	-1451,66	69,7045	-20,8258	0,002298
Ureia (x ₃)	-250,09	69,7045	-3,5878	0,069665
Tampão Fosfato (x ₄)	-221,34	69,7045	-3,1754	0,086500
Metanol (x ₅)	-1468,90	69,7045	-21,0733	0,002244
Biotina (x ₆)	508,80	69,7045	7,2994	0,018256

Com a retirada e a fixação dos valores de alguns componentes do meio padrão, foi utilizado para a otimização sequenciada do processo, aumentando as concentrações utilizadas correspondentes aos pontos axiais das variáveis que apresentaram efeito significativo no PB-II, sendo eles extrato de levedura e biotina. Utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional e este apresentou um aumento de 31% na atividade amilolítica em relação ao experimento anterior (PB-II), tendo aumento dos valores de 5,97 para 7,85 U/mL, como pode ser observado na tabela 25.

A análise de variância (ANOVA) disponibiliza dados de relevada importância, valores de Probabilidade de *Fisher*, pois indica quão significativo são os valores que passaram pela avaliação, falta de ajuste do experimento, erros, assim como as interações ocorridas. Outros apontamentos destacados são interações e resíduos – *lack of fit* – que é somando ao erro puro; a soma dos quadrados dos fatores. Todas essas informações são importantes para avaliação do experimento e escolha do modelo. O efeito dos fatores avaliados é diretamente proporcional ao valor da soma dos quadrados expostos nessa análise.

Tabela 25: Resultado da atividade da enzima Glicoamilase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional para otimização do meio

Componentes			
Experimentos	Extrato de levedura (x ₁)	Biotina (X ₂)	Glucose (Y ₁ U/mL)
1	-1 (7,00)	-1 (5,00)	6,20
2	-1 (7,00)	1 (29,00)	7,07
3	1 (35,00)	-1 (5,00)	5,15
4	2 (35,00)	1 (29,00)	5,91
5	-1,41 (1,20)	0 (17,00)	8,40
6	1,41 (40,80)	0 (17,00)	6,13
7	0 (21,00)	-1,41 (0,03)	7,52
8	0 (21,00)	1,41 (33,97)	7,85
9 (C)	0 (21,00)	0 (17,00)	7,86
10 (C)	0 (21,00)	0 (17,00)	8,31
11 (C)	0 (21,00)	0 (17,00)	8,17
Média			6455,54
Desvio-padrão			2033,95

Os resultados obtidos através da análise da ANOVA (tabela 26) é possível verificar pelo valor de p que o componente extrato de levedura tanto linear quanto quadrático foram significativos na atividade da enzima glicoamilase o que pode ser confirmado pelo diagrama de Pareto (figura 14)

Tabela 26: Análise de ANOVA das atividades a enzima Glicoamilase Resultado da atividade do Delineamento Composto Central Rotacional

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p_{valor}
(1)EL (L)	6815403	1	6815403	21,0129	0,044441
EL (Q)	34061475	1	34061475	105,0165	0,009388
(2)BIO (L)	183595	1	183595	0,5660	0,530328
BIO (Q)	85778	1	85778	0,2645	0,658255
1L by 2L	657116	1	657116	2,0260	0,290615
Lack of Fit	7143320	3	2381107	7,3413	0,122239
Erro Puro	648688	2	324344		
Soma Total	51728329	10			

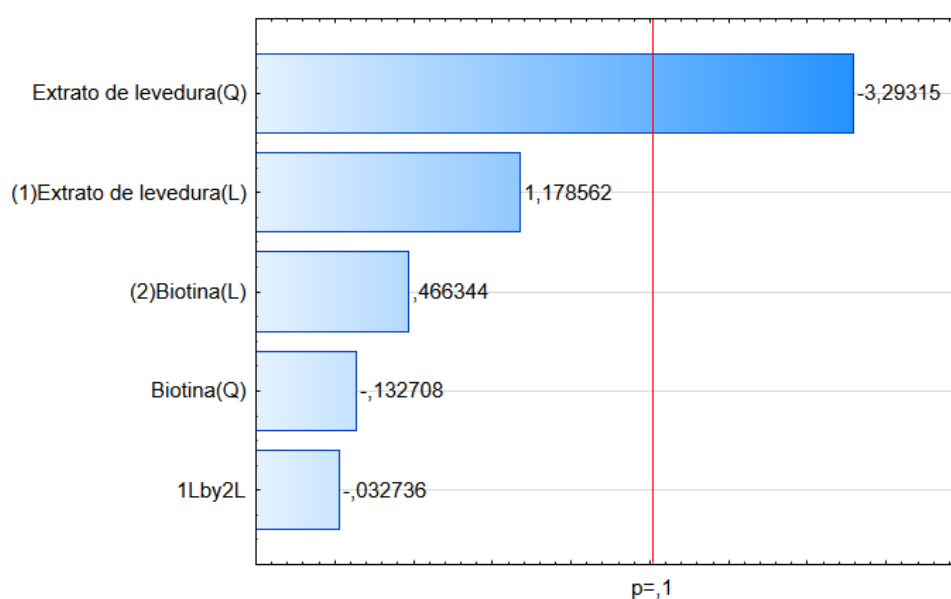


Figura 14: Diagrama de Pareto do delineamento Composto Central Rotacional para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima glicoamilase

Estão representados na tabela 27 os parâmetros lineares (L), as interações e os quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas. Os valores em destaque da Tabela 18 representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com níveis de significância (p_{valor}) inferiores a 10% para a atividade da glicoamilase.

Tabela 27: Coeficiente de Regressão para a resposta da enzima Glicoamilase

	Coeficiente de Regressão	Erro Puro	<i>t</i>₍₂₎	<i>p</i>_{valor}
Média/interação	7210,56	328,8079	21,9294	0,002073
(1) Extrato Levedura (L)	923,00	201,3529	4,5840	0,044441
Extrato Levedura (Q)	-2455,96	239,6579	-10,2478	0,009388
(2)Biotina (L)	151,49	201,3529	0,7524	0,530328
Biotina (Q)	-123,25	239,6579	-0,5143	0,658255
1L by 2L	-405,31	284,7560	-1,4234	0,290615

O modelo matemático predito para que houvesse a validação da otimização proposta, o teste F foi significativo sendo o modelo gerado adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta (figuras 15). Para a atividade enzimática obteve-se um modelo de segunda ordem. A Equação 10 apresenta os parâmetros significativos e não significativos para resposta da atividade amilolítica. Após a eliminação dos parâmetros não significativos com nível de significância (*p*_{valor}) inferior a 10%, foi obtida a Equação 11, ou seja, os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. Os valores preditos pelo ótimo apontado, com confiabilidade de 90%, ficou em valores entre 6,39 e 8,23 U/mL. Sendo as condições ótimas da concentração da fonte de nitrogênio para glicoamilase se deu em 23,22 g/L de extrato de levedura e 21,24% de biotina para a produção da mesma no meio otimizado. Depois da otimização foi possível a retirada da ureia e da peptona fazendo com que os custos relacionados ao preparo do meio sejam reduzidos.

$$Z = 7210,6 + 923xX_1 - 2456,0x X_1^2 + 151,5x X_2 - 123,2x X_2^2 - 405,3x X_1x X_2 + 0 \quad (10)$$

$$Z = 7210,6 + 923x X_1 - 2456,0x X_1^2 \quad (11)$$

Onde, X_1 é concentração de extrato de levedura e X_2 concentração de biotina

O coeficiente de correlação R^2 foi de 0,85. Este valor de R^2 indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 85% da variabilidade dos dados. As superfícies de resposta e curvas de contorno são apresentadas, respectivamente, nas Figuras 15 e 16.

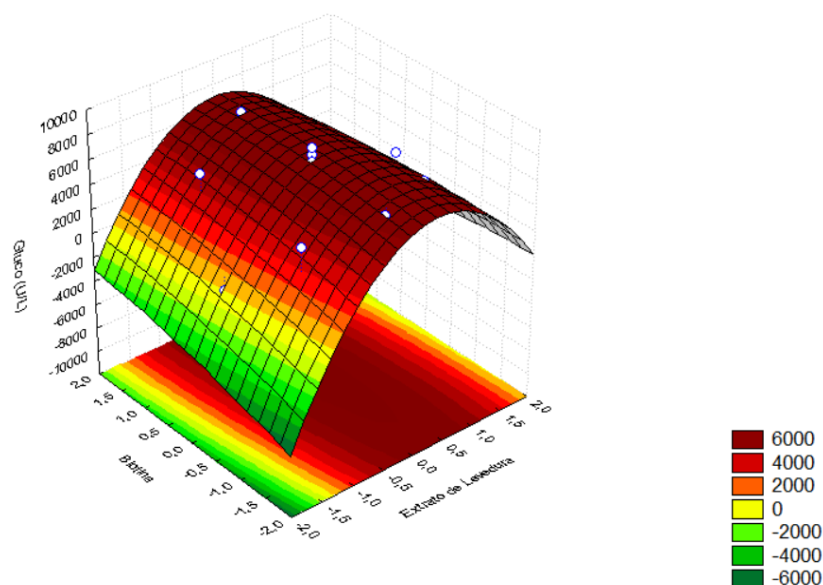


Figura 15: Superfície de resposta para a atividade amilolítica da glicoamilase do estudo do DCCR mostrando que tanto as concentrações de extrato de levedura quanto de biotina apresentam-se em área amplamente otimizada.

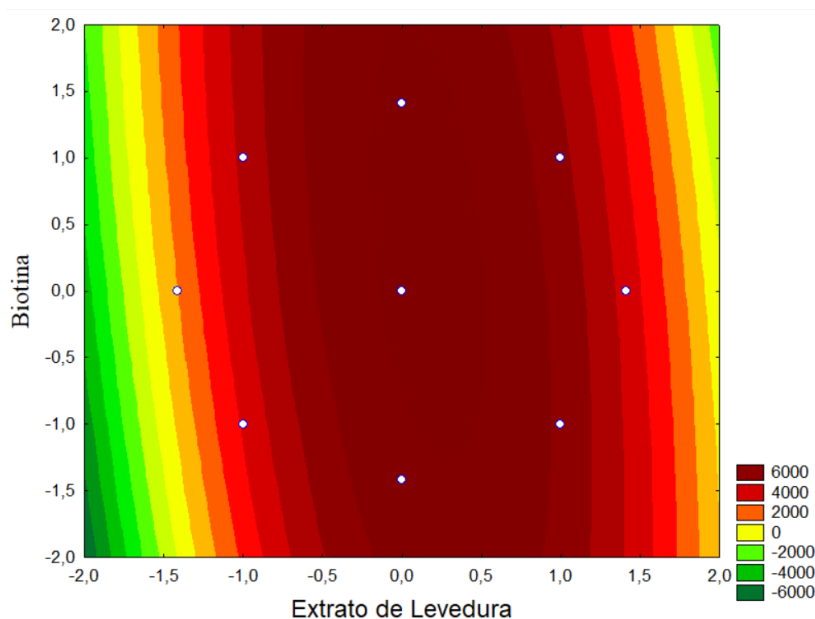


Figura 16: Curva de contorno para a atividade amilolítica da glicoamilase

Ao se observar a superfície de resposta e as curvas de contorno, nota-se que as condições de maiores atividades são obtidas nas concentrações da condição do ponto central, conquanto apresenta uma região nas curvas de contorno que valores um pouco menores do ponto central levaria às mesmas respostas quanto a atividade amilolítica.

Por isso, foram realizados experimentos nessas condições nas quais foi possível validar a superfície de resposta.

Essa estratégia sequencial, utilizada para otimização do meio padrão além de possibilitar a formulação da composição do meio que nos leva a atingir a máxima produção, consegue diminuir o custo final do processo, por nos permitir a realização do mesmo com um número bastante reduzido de ensaios, sem que os mesmos percam a qualidade de informação dos resultados. Ao final da otimização do meio padrão para a enzima recombinante glicoamilase a atividade amilolítica que no início era de 3,93 passou para 7,49 U/mL, correspondendo a um aumento de aproximadamente 90,6% sua atividade sacarificante.

5.1.2 Otimização da produção da α -amilase

Para a otimização do meio de produção da α -amilase utilizou-se o mesmo artifício já mencionado para a glicoamilase, que foi o estudo de delineamentos sequenciados iniciando com um *Plackett & Burman*. Na tabela 28 estão apresentados os resultados das atividades do delineamento PB I para α -amilase. Neste delineamento houve efeito dos componentes do meio com atividade variando de 306,62 a 310,01 U/mL de atividade dextrinizante. Por meio do Diagrama de Pareto (figura 17) pode-se observar que todos os componentes apresentaram importância significativa, $p < 0,10$ com exceção do extrato de levedura. Observando a tabela 29 verifica-se os efeitos sendo positivo nos componentes extrato de levedura, metanol e biotina. Diante das análises realizadas foram tomadas as seguintes decisões para realização do segundo passo, o experimento Fatorial Fracionado, os componentes que apresentaram efeito negativo, peptona, ureia e tampão fosfato foram testados em nível mínimo (-1) tendo valor 0 (zero) e mantendo como máximo (+1) o valor da tabela anterior, essa decisão foi tomada para verificar se esses componentes poderiam ser retirados do meio padrão. O extrato de levedura que teve seu *p-valor* na mesma ordem de grandeza do limite de significância, também foi levado para o sequencial, já que apontou efeito positivo, teve seu valor de máximo (+1) aumentado, assim como o metanol e a biotina, pois os valores dos pontos centrais apresentaram valores de atividade menores comparadas com outros pontos fatoriais, o que indica uma tendência de aumento no sentido do ponto máximo de atividade que pode ser alcançada pela enzima.

Tabela 28: Resultado da atividade do PB I para otimização dos componentes do Meio Padrão da enzima α -amilase

Experimento	Componentes do Meio Padrão						Atividade Alfa (Y _i , U/mL)
	Extrato de levedura (x ₁)	Peptona (x ₂)	Ureia (x ₃)	Tampão fosfato (x ₄)	Metanol (x ₅)	Biotina (x ₆)	
1	1 (27,50)	-1 (5,00)	1 (3,69)	-1 (0,03)	-1 (0,13)	-1 (2,00)	307,85
2	1 (27,50)	1 (55,00)	-1 (0,34)	1 (0,28)	-1 (0,13)	-1 (2,00)	307,48
3	-1 (2,50)	1 (55,00)	1 (3,69)	-1 (0,03)	1 (1,13)	-1 (2,00)	308,07
4	1 (27,50)	-1 (5,00)	1 (3,69)	1 (0,28)	-1 (0,13)	1 (10,00)	307,74
5	1 (27,50)	1 (55,00)	-1 (0,34)	1 (0,28)	1 (1,13)	-1 (2,00)	307,56
6	1 (27,50)	1 (55,00)	1 (3,69)	-1 (0,03)	1 (1,13)	1 (10,00)	308,04
7	-1 (2,50)	1 (55,00)	1 (3,69)	1 (0,28)	-1 (0,13)	1 (10,00)	306,74
8	-1 (2,50)	-1 (5,00)	1 (3,69)	1 (0,28)	1 (1,13)	-1 (2,00)	306,62
9	-1 (2,50)	-1 (5,00)	-1 (0,34)	1 (0,28)	1 (1,13)	1 (10,00)	308,64
10	1 (27,50)	-1 (5,00)	-1 (0,34)	-1 (0,03)	1 (1,13)	1 (10,00)	310,01
11	-1 (2,50)	1 (55,00)	-1 (0,34)	-1 (0,03)	-1 (0,13)	1 (10,00)	307,85
12	-1 (2,50)	-1 (5,00)	-1 (0,34)	-1 (0,03)	-1 (0,13)	-1 (2,00)	308,19
13 (C)	0 (15,00)	0 (30,00)	0 (2,011)	0 (0,15)	0 (0,63)	0 (6,00)	307,41
14 (C)	0 (15,00)	0 (30,00)	0 (2,011)	0 (0,15)	0 (0,63)	0 (6,00)	308,11
15 (C)	0 (15,00)	0 (30,00)	0 (2,011)	0 (0,15)	0 (0,63)	0 (6,00)	308,19
Média							307,90
Desvio-padrão							0,766

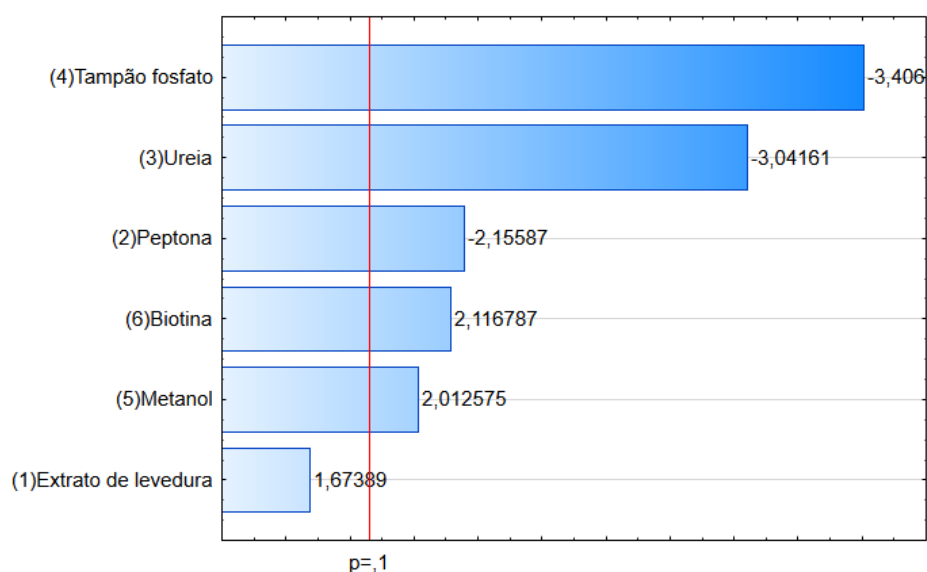


Figura 17: Diagrama de Pareto do delineamento *Plackett & Burman* I utilizada para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima α -amilase

Tabela 29: Tabela de efeitos para a resposta do *Plackett & Burman I* da enzima α -amilase

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	615800,50	222,9860	2761,616	0,000000
Extrato Levedura (x_1)	856,9	498,6118	1,719	0,227832
Peptona (x_2)	-1105,27	498,6118	-2,217	0,156957
Ureia (x_3)	-1552,35	498,6118	-3,113	0,089530
Tampão Fosfato (x_4)	-1751,05	498,6118	-3,512	0,072388
Metanol (x_5)	1030,76	498,6118	2,067	0,174650
Biotina (x_6)	1080,44	498,6118	2,167	0,162571

Os resultados do Fatorial Fracionado (tabela 30) apresentaram um avanço no aumento das atividades enzimáticas, passando de 310,01 U/mL, valor máximo no primeiro experimento, para 640,25 U/mL representando mais de 100% de aumento confirmando que os limites estudados nessa etapa estavam de acordo para seguir a otimização. Os efeitos dos parâmetros são apresentados no Diagrama de Pareto apresentado na Figura 18. Constatou-se, pelos resultados dos efeitos da tabela 31, que a ureia sendo testada em valor nulo não apresentou, estatisticamente, importância significativa e com efeito negativo nos níveis estudados para a atividade amilolítica da α -amilase, e assim foi retirada do meio. Os três componentes mais significativos dessa etapa, peptona, tampão fosfato e o extrato de levedura, foram levados para etapa seguinte, o DCCR, com seus níveis aumentados por apresentarem efeitos positivos para a atividade sendo que os valores dos pontos centrais apresentaram valores de atividade menores comparadas com outros pontos fatoriais, indicando possível tendência de aumento no sentido do ponto máximo de atividade que pode ser alcançada pela enzima. O metanol apresentando significância estatística, mas com efeito negativo foi fixado seu valor no nível mínimo (-1) estudado o que ocorreu também com a biotina por apresentar efeito positivo.

Tabela 30: Resultado do Fatorial Fracionado da enzima α -amilase para otimização dos componentes do Meio Padrão

Experimentos	Componentes do meio						ALFA (Y _i , U/mL)
	Extrato de levedura (x ₁)	Peptona (x ₂)	Ureia (x ₃)	Tampão fosfato (x ₄)	Metanol (x ₅)	Biotina (x ₆)	
1	-1(5,00)	-1(10,00)	-1(0,00)	-1(0,03)	-1(0,13)	-1(0,00)	633,09
2	1(50,00)	-1(10,00)	-1(0,00)	-1(0,03)	1(1,13)	1(10,00)	633,14
3	-1(5,00)	1(70,00)	-1(0,00)	-1(0,03)	1(1,13)	1(10,00)	632,08
4	1(50,00)	1(70,00)	-1(0,00)	-1(0,03)	-1(0,13)	-1(0,00)	632,98
5	-1(5,00)	-1(10,00)	1(3,69)	-1(0,03)	1(1,13)	-1(0,00)	632,22
6	1(50,00)	-1(10,00)	1(3,69)	-1(0,03)	-1(0,13)	1(10,00)	633,34
7	-1(5,00)	1(70,00)	1(3,69)	-1(0,03)	-1(0,13)	1(10,00)	632,63
8	1(50,00)	1(70,00)	1(3,69)	-1(0,03)	1(1,13)	-1(0,00)	632,03
9	-1(5,00)	-1(10,00)	-1(0,00)	1(0,27)	-1(0,13)	1(10,00)	631,37
10	1(50,00)	-1(10,00)	-1(0,00)	1(0,27)	1(1,13)	-1(0,00)	634,04
11	-1(5,00)	1(70,00)	-1(0,00)	1(0,27)	1(1,13)	-1(0,00)	631,92
12	1(50,00)	1(70,00)	-1(0,00)	1(0,27)	-1(0,13)	1(10,00)	634,14
13	-1(5,00)	-1(10,00)	1(3,69)	1(0,27)	1(1,13)	1(10,00)	631,57
14	1(50,00)	-1(10,00)	1(3,69)	1(0,27)	-1(0,13)	-1(0,00)	633,59
15	-1(5,00)	1(70,00)	1(3,69)	1(0,27)	-1(0,13)	-1(0,00)	633,49
16	1(50,00)	1(70,00)	1(3,69)	1(0,27)	1(1,13)	1(10,00)	640,25
17 (C)	0 (27,50)	0 (40,00)	0 (1,85)	0 (0,15)	0 (0,63)	0 (5,00)	632,68
18 (C)	0 (27,50)	0 (40,00)	0 (1,85)	0 (0,15)	0 (0,63)	0 (5,00)	633,34
19 (C)	0 (27,50)	0 (40,00)	0 (1,85)	0 (0,15)	0 (0,63)	0 (5,00)	632,63
Média							633,19
Desvio-padrão							1,83

Tabela 31: Tabela de efeitos para a resposta do Fatorial Fracionado da enzima α -amilase

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	16407,79	0,48	34080,38	0,000000
Curvatura	312,92	2,42	129,13	0,000060
Extrato Levedura (x ₁)	217,63	0,96	226,02	0,000020
Peptona (x ₂)	261,12	0,96	271,19	0,000014
Ureia (x ₃)	-33,88	0,96	-35,19	0,000807
Tampão Fosfato (x ₄)	254,19	0,96	263,99	0,000014
Metanol (x ₅)	-157,43	0,96	-163,50	0,000037
Biotina (x ₆)	7,09	0,96	7,36	0,017942

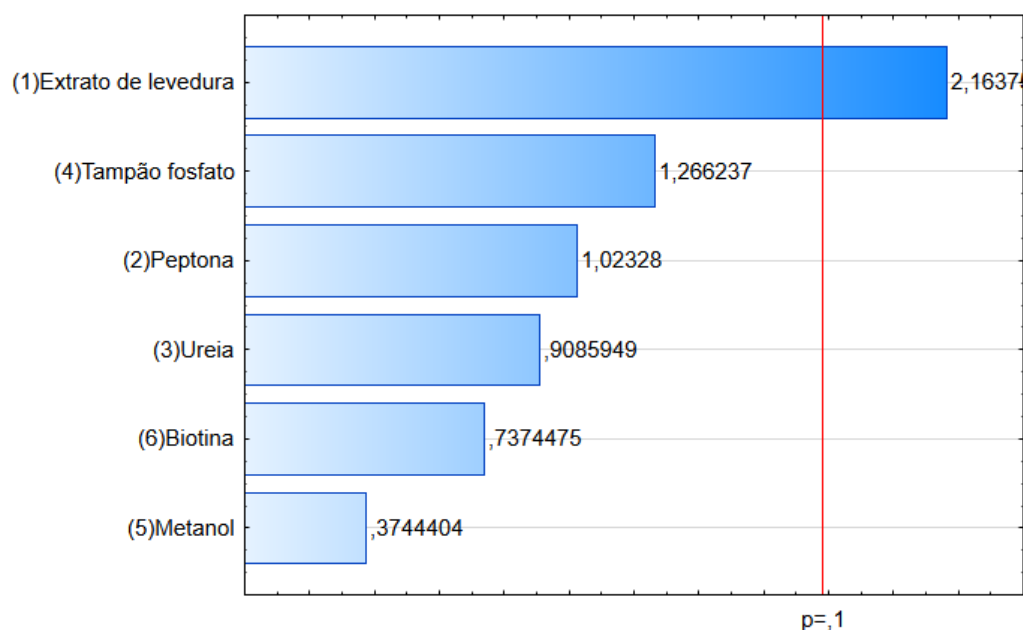


Figura 18: Diagrama de Pareto do Fatorial Fracionado da enzima α -amilase

Os resultados do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I) estão expostos nas tabelas 32 os valores das atividades variaram de 316,06 a 330,23 U/mL. Observando o Diagrama de Pareto (figura 19) nos revela que o tampão fosfato o extrato de levedura foram significativamente estatisticamente. Observando a ANOVA desse experimento (tabela 34), verificamos que os modelos foram adequados para descrever os dados, uma vez que, a falta de ajuste (*Lack of Fit*) não foi significativa ($p>0,1$), e a % da variação explicada (R^2) pela regressão foi de 94,5%, evidenciando a significância dos modelos.

Tabela 32: Resultado da atividade da enzima α -amilase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I) para otimização do meio

Experimentos	Componentes do meio			
	Tampão fosfato (x ₁)	Extrato Levedura (x ₂)	Peptona (x ₃)	ALFA (Y ₁ , U/mL)
1	-1 (0,70)	-1 (4,00)	-1 (30,00)	317,25
2	-1 (0,70)	-1 (4,00)	1 (70,00)	328,99
3	-1 (0,70)	1 (12,00)	-1 (30,00)	316,54
4	-1 (0,70)	1 (12,00)	1 (70,00)	326,20
5	1 (1,10)	-1 (4,00)	-1 (30,00)	317,58
6	1 (1,10)	-1 (4,00)	1 (70,00)	330,23

7	1 (1,10)	1 (12,00)	-1 (30,00)	318,43
8	1 (1,10)	1 (12,00)	1 (70,00)	319,44
9	-1,68 (0,56)	0 (8,00)	0 (50,00)	316,06
10	1,68 (1,24)	0 (8,00)	0 (50,00)	330,00
11	0 (0,90)	-1,68 (1,27)	0 (50,00)	330,18
12	0 (0,90)	1,68 (14,73)	0 (50,00)	325,19
13	0 (0,90)	0 (8,00)	-1,68 (16,36)	318,40
14	0 (0,90)	0 (8,00)	1,68 (83,64)	319,57
15 (C)	0 (0,90)	0 (8,00)	0 (50,00)	320,15
16 (C)	0 (0,90)	0 (8,00)	0 (50,00)	319,69
17 (C)	0 (0,90)	0 (8,00)	0 (50,00)	320,17
Média				322,00
Desvio-padrão				5,05

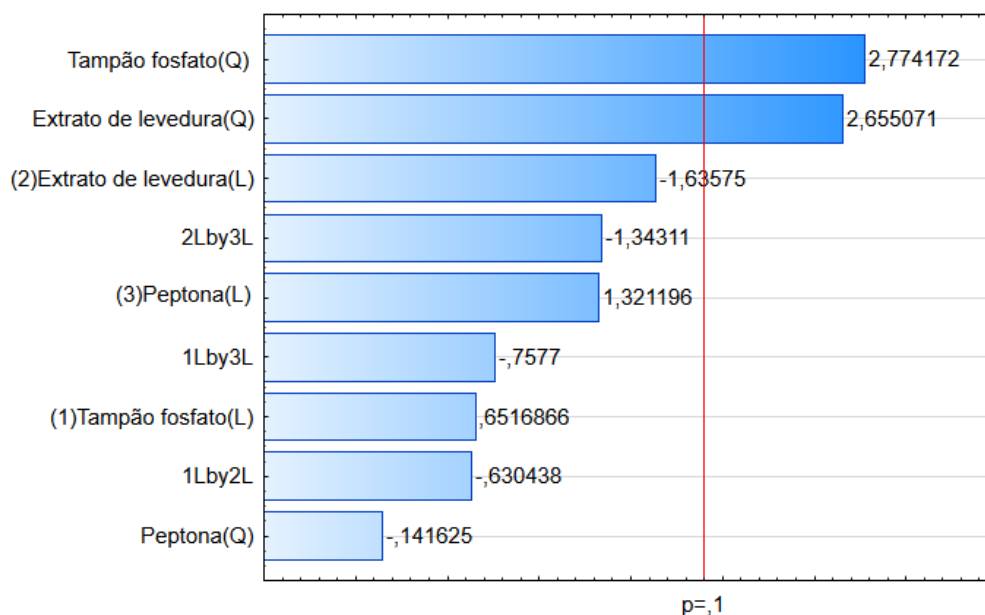


Figura 19: Diagrama de Pareto do DCCR I da enzima α -amilase

Tabela 33: Tabela de efeitos para a resposta do DCCR I da enzima α -amilase

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	16226,31	41,44844	391,4818	0,000007
(1)Tampão (L)	517,86	38,95185	13,2950	0,005610
Tampão (Q)	-13,60	42,91238	-0,3169	0,781351
(2)Extrato levedura(L)	-75,39	38,95185	-1,9354	0,192586
Extrato levedura(Q)	233,86	42,91238	5,4498	0,032059
(3)Peptona (L)	1,81	38,95185	0,0465	0,967143
Peptona (Q)	-136,44	42,91238	-3,1794	0,086311
1L by 2L	-200,77	50,87058	-3,9467	0,058613
1L by 3L	-153,49	50,87058	-3,0173	0,094524
2L by 3L	-70,28	50,87058	-1,3816	0,301178

Tabela 34: Análise de ANOVA das atividades a enzima α -amilase Resultado da atividade do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR I)

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p-valor
(1)Tampão (L)	914829	1	914829,3	176,7570	0,005610
Tampão (Q)	520	1	519,7	0,1004	0,781351
(2)Extrato levedura(L)	19387	1	19386,6	3,7458	0,192586
Extrato levedura(Q)	153718	1	153717,8	29,7003	0,032059
(3)Peptona (L)	11	1	11,2	0,0022	0,967143
Peptona (Q)	52319	1	52318,5	10,1086	0,086311
1L by 2L	80616	1	80616,4	15,5761	0,058613
1L by 3L	47120	1	47119,7	9,1041	0,094524
2L by 3L	9880	1	9879,9	1,9089	0,301178
Lack of Fit	61976	5	12395,1	2,3949	0,320323
Erro Puro	10351	2	5175,6		
Soma Total	1431700	16			

Com a retirada e a fixação dos valores de alguns componentes do meio padrão, buscou-se o aumentando as concentrações utilizadas correspondentes aos pontos axiais das variáveis que apresentaram efeito significativo no DCCR I, sendo eles extrato de levedura e tampão fosfato. Os resultados desse novo delineamento estão demonstrados na tabela 35 com valores de atividades variando entre 158,02 e 161,99 U/mL.

Tabela 35: Resultado da atividade da enzima α -amilase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional DCCR II para otimização do meio

Experimentos	Componentes		α -amilase (Y ₁ U/mL)
	Tampão (x ₁)	Extrato de levedura (X ₂)	
1	-1 (0,70)	-1 (15,00)	158,22
2	-1 (0,70)	1 (25,00)	158,35
3	1 (1,10)	-1 (15,00)	161,25
4	1 (1,10)	1 (25,00)	161,72
5	-1,41 (0,62)	0 (20,00)	158,02
6	1,41 (1,18)	0 (20,00)	161,70
7	0 (0,90)	-1,41 (12,95)	160,58
8	0 (0,90)	1,41 (87,05)	161,83
9 (C)	0 (0,90)	0 (20,00)	161,10
10 (C)	0 (0,90)	0 (20,00)	161,99
11 (C)	0 (0,90)	0 (20,00)	161,35
Média			160,56
Desvio-padrão			1,49

Os resultados obtidos através da análise da ANOVA (tabela 36) é possível verificar pelo valor de p que o componente tampão fosfato tanto linear quanto quadrático foram significativos na atividade da enzima α -amilase, porém com o quadrático indicando efeito negativo apontando que o modelo estudado seria de primeira ordem o que pode ser confirmado pelo Diagrama de Pareto (figura 20); o sistema não apresentou falta de ajuste indicando a otimização do meio.

Tabela 36: Análise de ANOVA das atividades a enzima α -amilase Resultado da atividade do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II)

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p_{valor}
(1)Tampão (L)	16850665	1	16850665	106,3466	0,001945
Tampão (Q)	5636352	1	5636352	35,5717	0,009430
(2)Extrato Levedura(L)	702253	1	702253	4,4320	0,125937
Extrato Levedura(Q)	456640	1	456640	2,8819	0,188145
1L by 2L	31152	1	31152	0,1966	0,687502
Lack of Fit	1182612	3	394204	2,4879	0,236906
Erro Puro	475351	3	158450		
Soma Total	24920441	11			

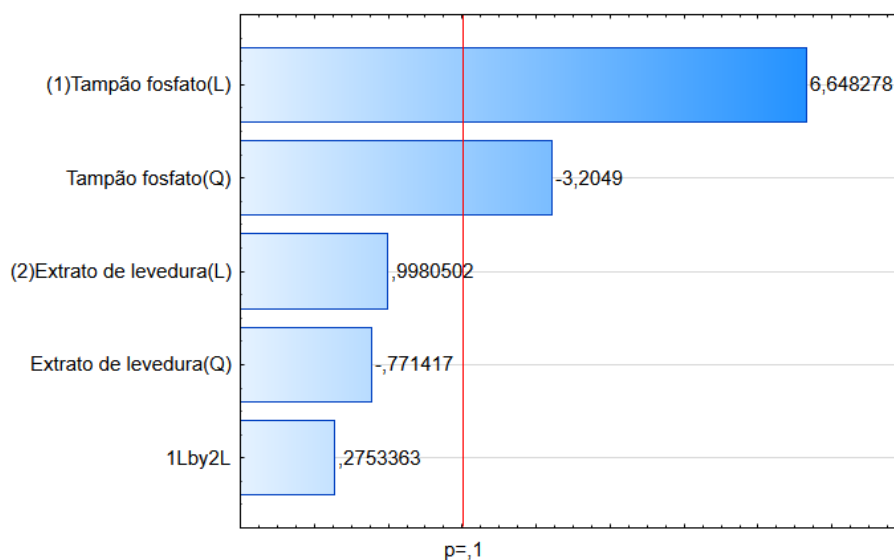


Figura 20: Diagrama de Pareto do delineamento Composto Central Rotacional para avaliação da influência das variáveis da composição Meio Padrão da enzima α -amilase

Estão representados na tabela 37 os parâmetros lineares (L), as interações e os quadráticos (Q) das duas variáveis estudadas. Os valores em destaque representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com níveis de significância (p_{valor}) inferiores a 10% para a atividade da α -amilase.

Tabela 37: Coeficiente de Regressão para a resposta da enzima α -amilase no DCCR II

	Coeficiente de Regressão	Erro Puro	$t_{(2)}$	p_{valor}
Média/interação	161413,9	199,0292	811,0062	0,000000
(1)Tampão (L)	1451,3	140,7349	10,3124	0,001945
Tampão (Q)	-938,4	157,3464	-5,9642	0,009430
(2)Extrato Levedura(L)	296,3	140,7349	2,1052	0,125937
Extrato Levedura(Q)	-267,1	157,3464	-1,6976	0,188145
1L by 2L	88,3	199,0292	0,4434	0,687502

O modelo matemático predito para que houvesse a validação da otimização proposta, o teste F foi significativo sendo o modelo gerado adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta (figura 21). Para a atividade enzimática obteve-se um modelo de primeira ordem já que o modelo quadrático não é efetivo quando verificado seus coeficientes de regressão. A equação 12 apresenta os parâmetros significativos e não significativos para resposta da atividade amilolítica. Após a eliminação dos parâmetros não significativos com nível de significância (p_{valor}) inferior a 10%, foi obtida a equação 13, ou seja, os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos. Os valores preditos pelo ótimo apontado, com confiabilidade de 90%, ficou em valores entre 160,04 e 162,46 U/mL. Sendo as condições ótimas da concentração da fonte de nitrogênio para glicoamilase se deu em 23,22 g/L de extrato de levedura e 1,06 M de tampão fosfato para a produção da mesma no meio otimizado sendo ainda a ureia retirada do meio.

$$Z = 161413,8 + 1451,3xX_1 - 938,4xX_1^2 + 296,3xX_2 - 267,1xX_2^2 + 88,2X_1xX_2 + 0 \quad (12)$$

$$Z = 161413,8 + 1451,3xX_1 + 296,3xX_2 + 88,2X_1xX_2 + 0 \quad (13)$$

Onde, X_1 é concentração de tampão fosfato e X_2 concentração de extrato de levedura

O coeficiente de correlação R^2 foi de 0,93. Este valor de R^2 indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 93% da variabilidade dos dados. As superfícies de resposta e curvas de contorno são apresentadas, respectivamente, nas Figuras 21 e 22.

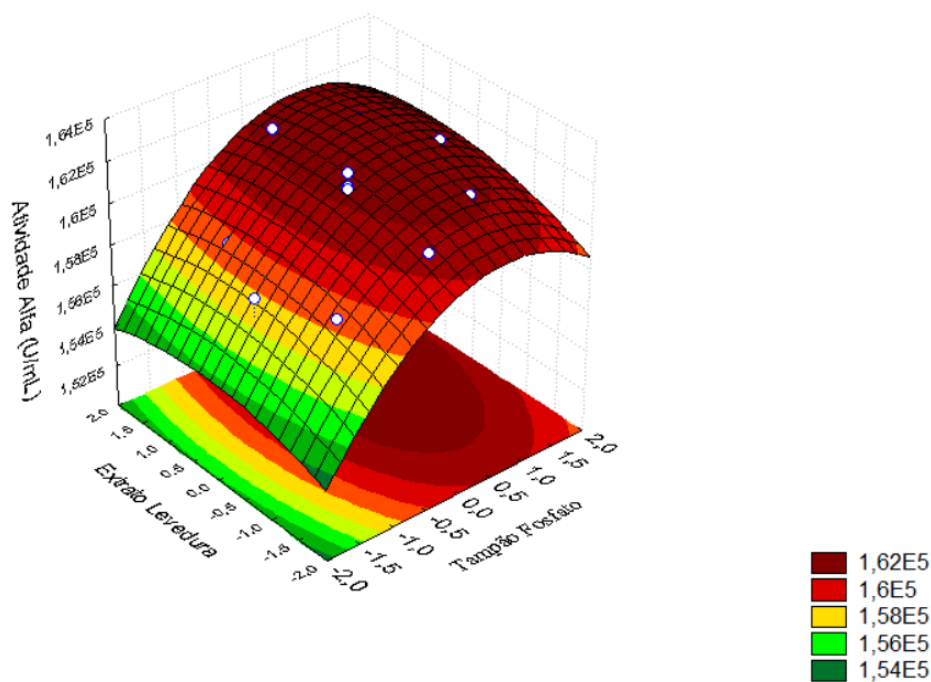


Figura 21: Superfície de resposta para a atividade amilolítica da α -amilase do estudo do DCCR II mostrando que tanto as concentrações de tampão fosfato e de extrato de levedura apresentam-se em área amplamente otimizada

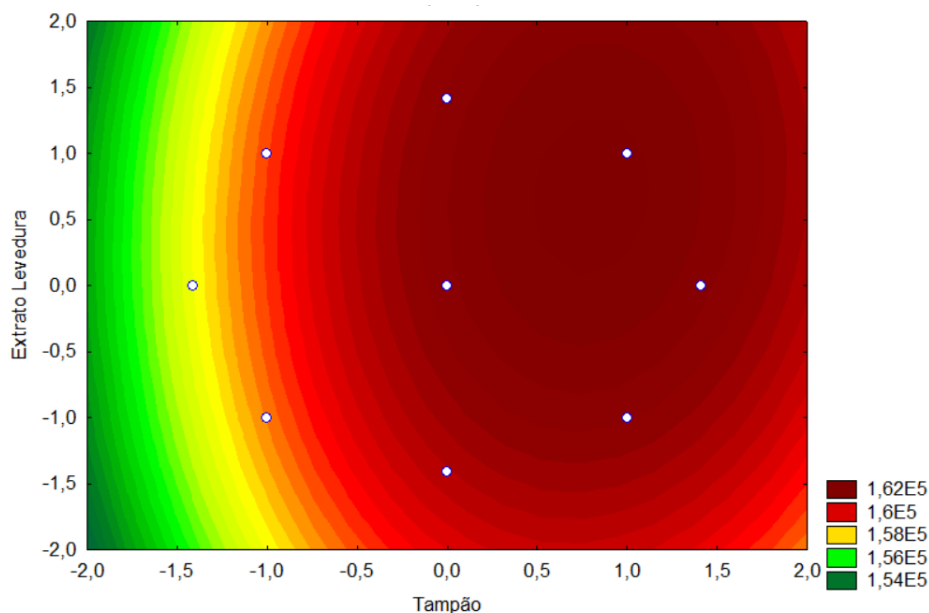


Figura 22: Curva de contorno para a atividade amilolítica da α -amilase do estudo do DCCR II mostrando que tanto as concentrações de tampão fosfato e de extrato de levedura apresentam-se em área amplamente otimizada

Ao se observar a superfície de resposta e as curvas de contorno, nota-se que as condições de maiores atividades são obtidas nas concentrações da condição do ponto central, conquanto apresenta uma região nas curvas de contorno que valores um pouco menores do ponto central levaria às mesmas respostas quanto a atividade amilolítica dextrinizante da α -amilase. Por isso, foi realizado experimentos nessas condições nas quais foi possível validar a superfície de resposta.

Essa estratégia sequencial, utilizada para otimização do meio padrão além de possibilitar a formulação da composição do meio que nos leva a atingir a máxima produção, consegue diminuir o custo final do processo, por nos permitir a realização do mesmo com um número bastante reduzido de ensaios, sem que os mesmos percam a qualidade de informação dos resultados. Ao final da otimização do meio padrão para a enzima recombinante α -amilase alcançou atividade amilolítica de 162,60 U/mL. No início da otimização o tempo de incubação era de 10 minutos ao final desse processo o mesmo ficou estabelecido em 2 minutos; levando a uma taxa de conversão do substrato 5 vezes maior que no início da otimização fazendo com que a velocidade da reação ocorresse bem mais rápida.

5.2 Produção e concentração por ultrafiltração tangencial do caldo enzimático

A utilização da tecnologia de concentração por ultrafiltração tangencial em sistema de membranas de fibras ocas com *cut-off* de 30 kDa mostrou-se um processo de profusa eficiência na função de concentrar os complexos amilásicos. Para α -amilase que partiu de um volume inicial de 10 L a concentração deu-se do valor inicial de atividade de 333,47 para 31755,71 U/mL; a glicoamilase teve um volume inicial de 18 L e valor inicial de atividade de 7,85 passando para 409,45 U/mL, demonstrando que não houve perda em relação às atividades de liquefação e sacarificação. No processo ambas foram concentradas em 100 vezes.

5.3 Avaliação da estabilidade das enzimas concentradas

As enzimas concentradas permanecem reservadas, e após 12 meses temos que a α -amilase permanece com 100% de atividade preservada tanto a que está sob refrigeração de 8 °C (± 3) quanto a que ficou em prateleira e 22 °C (± 4). A glicoamilase apresentou perda de atividade em aproximadamente 20% na amostra que está sob

refrigeração de 8 °C (± 3) e 26,67% na amostra que ficou em prateleira a 22°C (± 4). Estando as mesmas *in natura*, ou seja, sem adição de estabilizantes mesmo após 12 meses de estocagem e apresentado essa pequena perda de atividade mostra que são estáveis e, portanto, adequadas a serem utilizadas em bioprocessos.

5.4 Avaliação da utilização do complexo enzimático concentrado na hidrólise de amido de mandioca

5.4.1 Quantificação do Teor de Amido na Fécula de Mandioca

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

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

5.4.2 Estudo da Hidrólise Enzimática

5.4.2.1 Estudo das cargas enzimáticas na hidrólise do amido da Fécula de Mandioca

Para a otimização das condições de hidrólise do amido da fécula de mandioca quanto a proporção das amilases (variáveis), utilizou-se o Delineamento Experimental de mixtura *simplex-centroid*, gerando uma matriz com 10 experimentos de acordo com a Tabela 38 onde estão dispostos os resultados do produto final variando de 1,47 e 11,68 g/L da concentração de glicose ao final da hidrólise. Por meio do Diagrama de Pareto (figura 23) gerado em $p \leq 0,05$, ou seja, 95% intervalo de confiança, mesmo a

enzima glicoamilase apontar como não significância ela apresenta efeito positivo assim como a α -amilase fazendo com que a interação entre as enzimas testadas torne-se fundamental para a realização de uma hidrólise eficiente. Diante do resultado positivo para essa etapa de estudo levou-se a mistura para ser validada através dos valores preditos, entre 6,25 e 15,34 g/L, pela análise do programa para se obter níveis mais elevados de concentração de glicose.

Tabela 38: Resultado da concentração de glicose do *design Simplex-centroid* para determinação do volume as amilases para hidrólise da fécula de mandioca

Experimentos	Replicat	Componentes		
		A-amilase (x ₁)	Glicoamilase (X ₂)	Glicose (Y ₁ g/mL)
1	1	1,0 (91,01)	0,00 (59,12)	3,79
2	1	0,0 (8,99)	1,00 (194,88)	1,59
3	1	0,50 (50,00)	0,50 (127,00)	8,87
4	1	0,75 (79,00)	0,25(79,00)	8,75
5	1	0,25 (21,00)	0,75 (175,00)	9,91
6	2	1,0 (91,01)	0,00 (59,12)	3,73
7	2	0,0 (8,99)	1,00 (194,88)	1,47
8	2	0,50 (50,00)	0,50 (127,00)	9,17
9	2	0,75 (79,00)	0,25(79,00)	11,68
10	2	0,25 (21,00)	0,75 (175,00)	9,72

A ANOVA (tabela 39) do *design simplex-centroid*, demonstrou que o modelo quadrático fornece um ajuste adequado aos dados, pois somente ele apresentou resultado significativo com $R^2 = 87\%$ e falta de ajuste não significativa.

Tabela 39: Análise de ANOVA *design Simplex-centroid* para determinação do volume de mistura das amilases para hidrólise da fécula de mandioca

Modelo	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p _{valor}
Linear	4,73	1	4,7286	0,30258	0,597285
Quadrático	107,98	1	107,9757	44,35081	0,000288
Cúbico especial	0,41	1	0,4132	0,14908	0,712737
Cúbico	16,63	0	0,0000		
Total Ajustado	129,75	9	14,4163		

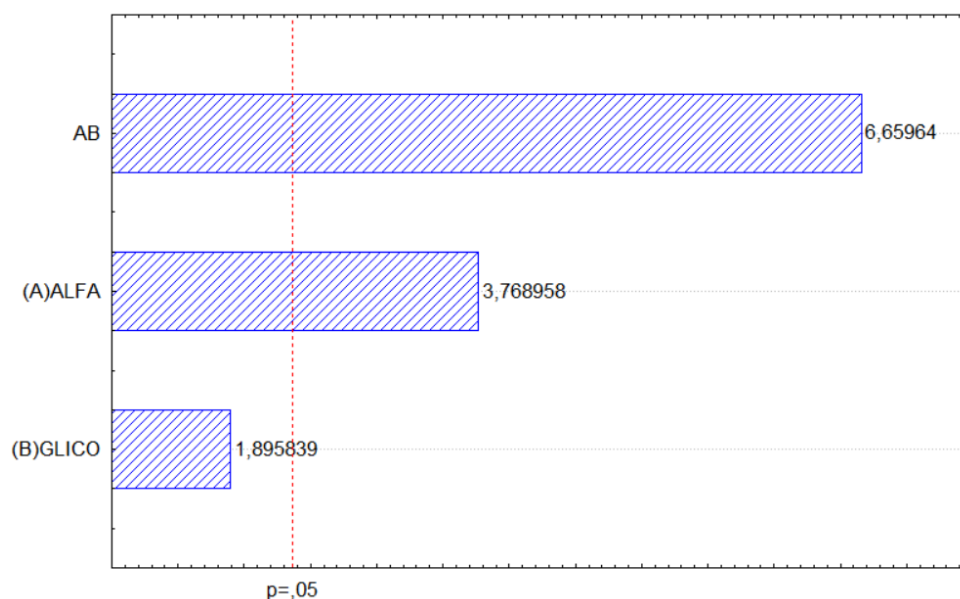


Figura 23: Diagrama de Pareto do delineamento *design Simplex-centroid* para determinação do volume de mistura das amilases para hidrólise da fécula de mandioca

Após validação da mistura otimizada, o *blend* foi preparado na proporção de 53% de α -amilase e 47% de glicoamilase em volume que atendesse aos percentuais de extrato enzimático solicitado. Em seguida, o *blend* foi utilizado para otimização do carregamento sólido:líquido na hidrólise da fécula de mandioca. Aquelas porcentagens são equivalentes a 1.680 e 19,27 U, respectivamente. O valor obtido na validação pelo ótimo apontado, com confiabilidade de 95%, foi 12,64 g/L de glicose se encaixando na faixa de preditos fornecidos pela análise do programa. Desta forma ao observamos na visualização do gráfico de superfície de resposta Figura 24 que o estudo das cargas enzimáticas para hidrólise da fécula de mandioca obteve um modelo da formulação do *blend* ideal mostrando a melhor concentração de enzimas para degradar determinada concentração de fécula.

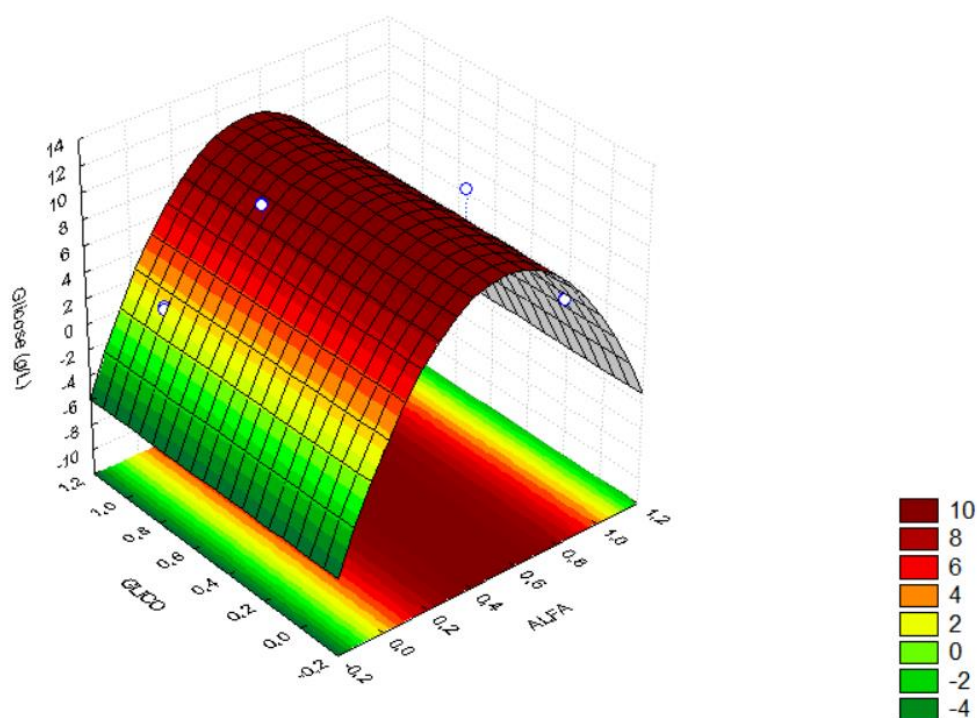


Figura 24: Superfície de resposta do delineamento *design Simplex-centroid* para determinação do volume de mistura das amilases para hidrólise da fécula de mandioca

5.4.2.2 Estudo da otimização da proporção sólido:líquido para hidrólise do amido de fécula de mandioca pela carga enzimática otimizada

Neste delineamento pode-se verificar uma variação de concentração de glicose entre 14,44 e 26,08 g/L a tabela 40 apresenta os resultados experimentais do delineamento rotacional. Por meio do Diagrama de Pareto verificou-se que os níveis adotados para realização desse Delineamento não apresentaram significância estatística, sendo confirmada através da análise quadrática que mostra efeito negativo indicando que a superfície de resposta não apresenta curvatura como demonstrado nas figura 26 e 27.

Diante das análises realizadas decidiu-se aumentar os níveis ampliando sua faixa de concentração tanto de sólido quanto de líquido já que o gráfico de superfície aponta a tendência de aumento no sentido do ponto de otimização para a hidrólise, tendo um R^2 de 72% confirmando que os níveis necessitavam de ajuste.

Tabela 40: Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCRI) para otimização da relação Sólido:Líquido

Experimentos	Componentes		
	Sólido (x ₁)	Líquido (X ₂)	Glicose (Y ₁ g/mL)
1	-1 (15,00)	-1 (300,00)	14,44
2	-1 (15,00)	1 (500,00)	17,65
3	1 (25,00)	-1 (300,00)	20,39
4	1 (25,00)	1 (500,00)	25,95
5	-1,41 (12,93)	0 (400,00)	19,41
6	1,41 (27,07)	0 (400,00)	24,90
7	0 (20,00)	-1,41 (258,58)	20,72
8	0 (20,00)	1,41 (541,42)	26,08
9 (C)	0 (20,00)	0 (400,00)	22,61
10 (C)	0 (20,00)	0 (400,00)	19,41
11 (C)	0 (20,00)	0 (400,00)	24,31

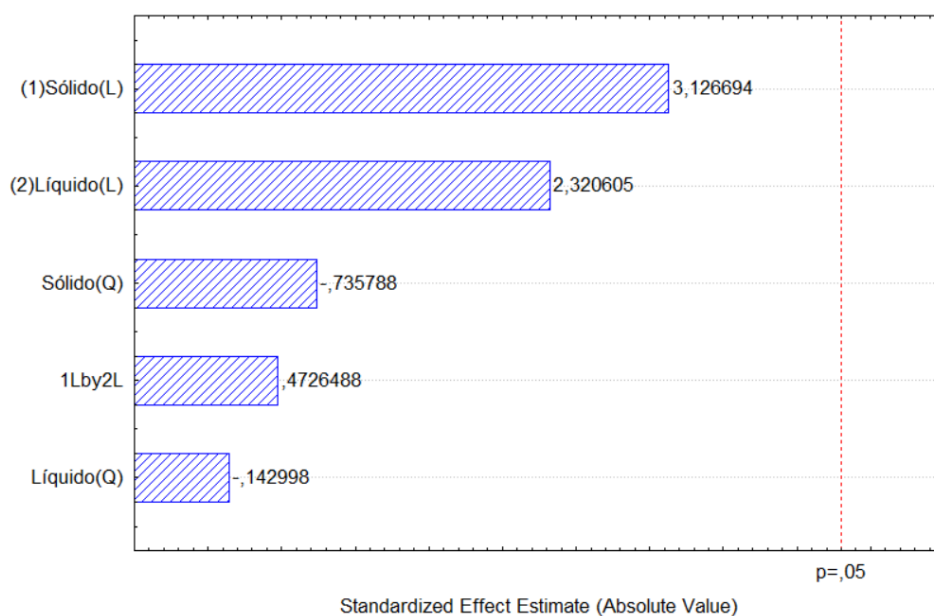


Figura 25: Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCRI) para otimização da relação Sólido:Líquido

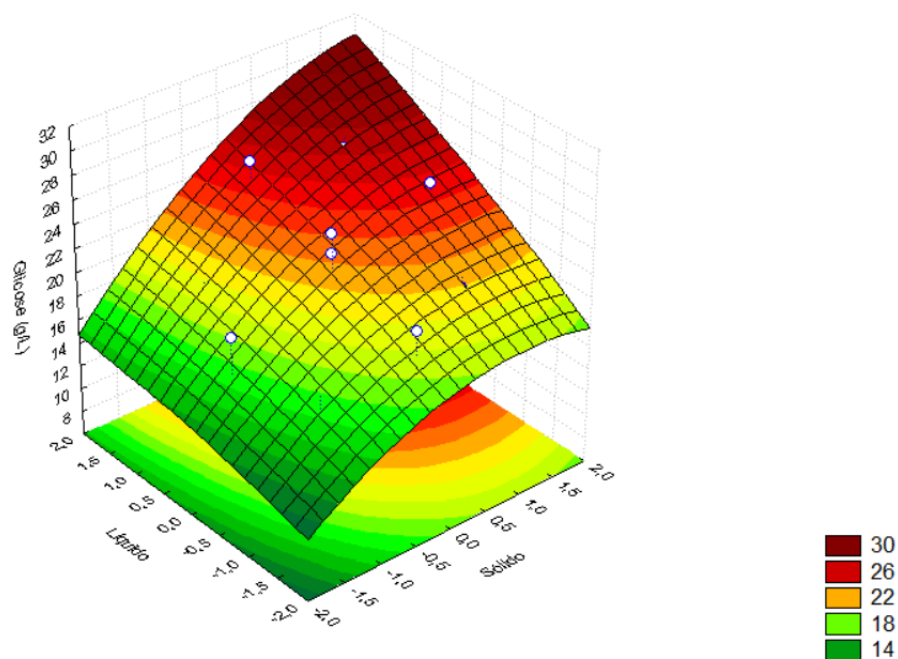


Figura 26: Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCRI) para otimização da relação Sólido:Líquido

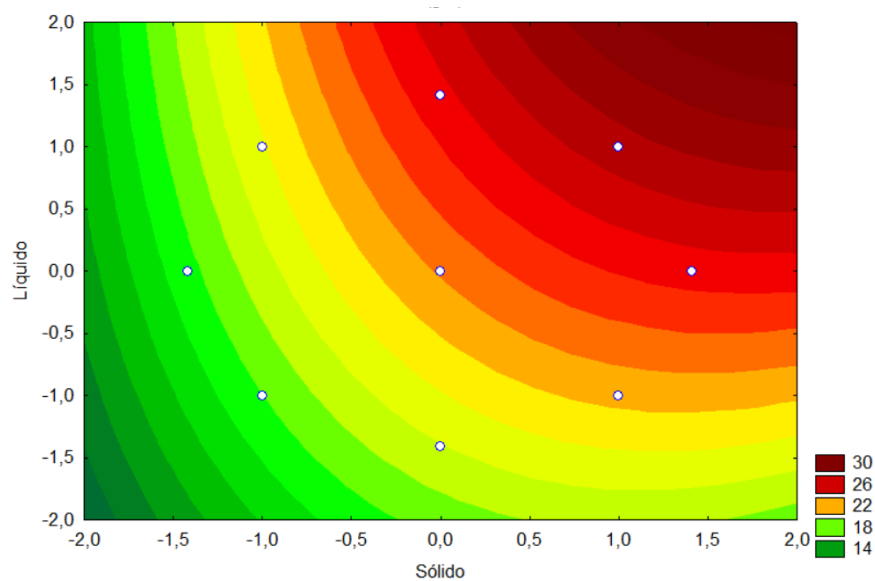


Figura 27: Curva de contorno Delineamento Composto Central Rotacional (DCCRI) para otimização da relação Sólido:Líquido

No DCCR II foi gerada a tabela 41 que apresenta os resultados obtidos e analisados nessa etapa para otimização da hidrólise e ajuste do processo sólido:líquido. Esse delineamento apresentou uma variação de concentração de glicose entre 0,00 e

89,14 g/L proporcionando, com o ajuste dos níveis iniciais, um aumento de 3,5 vezes da concentração de glicose ao final da hidrólise, porém, mesmo com esse aumento podemos verificar através do Diagrama de Pareto (figura 28), segundo Barros (2010), ambas variáveis apresentaram significância estatística quando observadas de forma linear de forma levar ao entendimento de que com o ajuste dos níveis, começou a ocorrer uma reação enzimática de primeira ordem entre os fatores e nos aponta nas figuras 29 e 30 que caberiam ajustes nos níveis afim de chegar a otimização do processo, tendo em vista também que este delineamento não apresentou falta de ajuste como mostra a análise de ANOVA descrita na Tabela 41. Vale ressaltar que o R^2 desse experimento foi de 96%.

Tabela 41: Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional DCCRII para otimização da relação Sólido:Líquido

Experimentos	Componentes		
	Sólido (x_1)	Líquido (x_2)	Glicose (Y_1 g/L)
1	-1 (10,00)	-1 (200,00)	7,67
2	-1 (10,00)	1 (1000,00)	22,04
3	1 (50,00)	-1 (200,00)	38,02
4	1 (50,00)	1 (1000,00)	89,14
5	-1,41 (1,72)	0 (600,00)	0,00
6	1,41 (58,28)	0 (600,00)	80,83
7	0 (30,00)	-1,41 (34,31)	1,60
8	0 (30,00)	1,41 (1165,69)	73,80
9 (C)	0 (30,00)	0 (600,00)	62,30
10 (C)	0 (30,00)	0 (600,00)	49,20
11 (C)	0 (30,00)	0 (600,00)	46,01

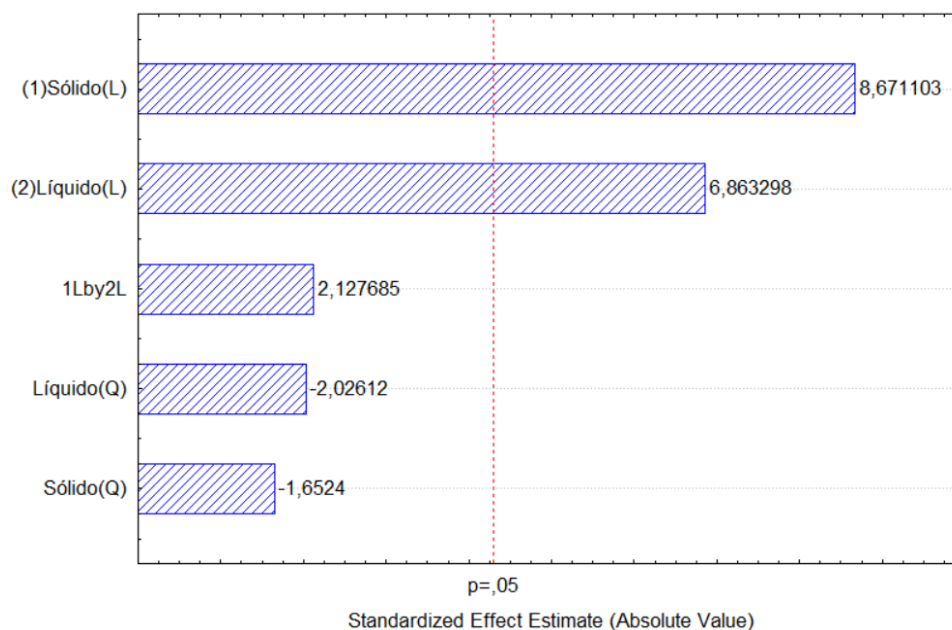


Figura 28: Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para otimização da relação Sólido:Líquido

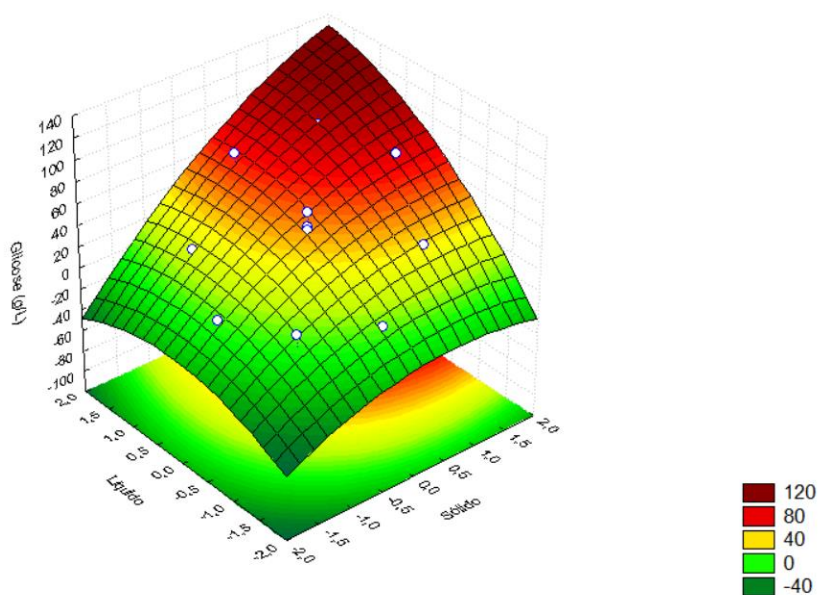


Figura 29: Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para otimização da relação Sólido:Líquido

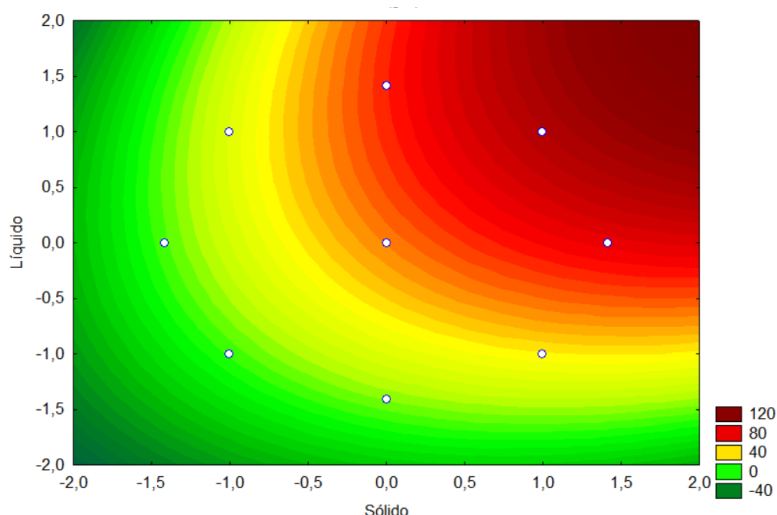


Figura 30: Curva de contorno Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para otimização da relação Sólido:Líquido

Tabela 42: Análise de ANOVA do Delineamento Composto Central Rotacional do estudo da hidrólise (sólido:líquido) (DCCR II)

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p _{valor}
(1)Sólido (L)	5605,07	1	5605,07	75,19	0,013040
Sólido (Q)	203,55	1	203,55	2,73	0,240259
(2)Líquido (L)	3511,54	1	3511,54	47,10	0,020576
Líquido (Q)	306,03	1	306,03	4,10	0,179995
1L by 2L	337,48	1	337,48	4,53	0,167184
Lack of Fit	203,22	3	67,74	0,91	0,561920
Erro Puro	149,09	2	74,55		
Soma Total	10203,52	10			

Com ajuste nos níveis através da observação dos resultados anteriores levou a validação, pelo delineamento DCCR III, da proporção ideal para a obtenção de concentração de glicose satisfatória, entre 78,22 e 213,19 g/L (tabela 43), através da liquefação e sacarificação feita pela mistura das amilases recombinantes. Desde o início do processo até a otimização, essa concentração apresentou um aumento aproximado de 8,2 vezes fazendo com que a concentração de glicose no meio seja satisfatória para ser levada a conversão a álcool. O Diagrama de Pareto, figura 31, mostra em 95% de confiança que a concentração de sólido (fécula de mandioca) tem grande significância e efeito positivo assim como a mistura das amilases demonstrando e confirmando que a tendência linear do modelo fornece um ajuste adequado aos dados ($p = 0,00$), $R^2 = 99\%$ e falta de ajuste não significativa (*Lack of Fit*: $p = 0,062$) dados dispostos na tabela 44 da

ANOVA. Observando a superfície de resposta e curvas de contorno nas figuras 32 e 33, podemos verificar a existência de uma região ótima que mantém o processo nessa condição para a hidrólise. O resultado de concentração obtido experimentalmente superou aos preditos pela função, indicando a validação das condições previstas pelo modelo. Dessa forma, a tabela 45 com os coeficientes de regressão confirma que para a hidrólise da fécula de mandioca o modelo da associação sólido:líquido ideal está representado pela equação abaixo:

$$Z = 184,05 + 28,72xX_1 - 33,07xX_1^2 + 17,04xX_2 - 0,48xX_2^2 + 16,87xX_1xX_2 + 0 \quad (14)$$

$$Z = 184,05 + 28,72xX_1 + 17,04xX_2 + 16,87xX_1xX_2 \quad (15)$$

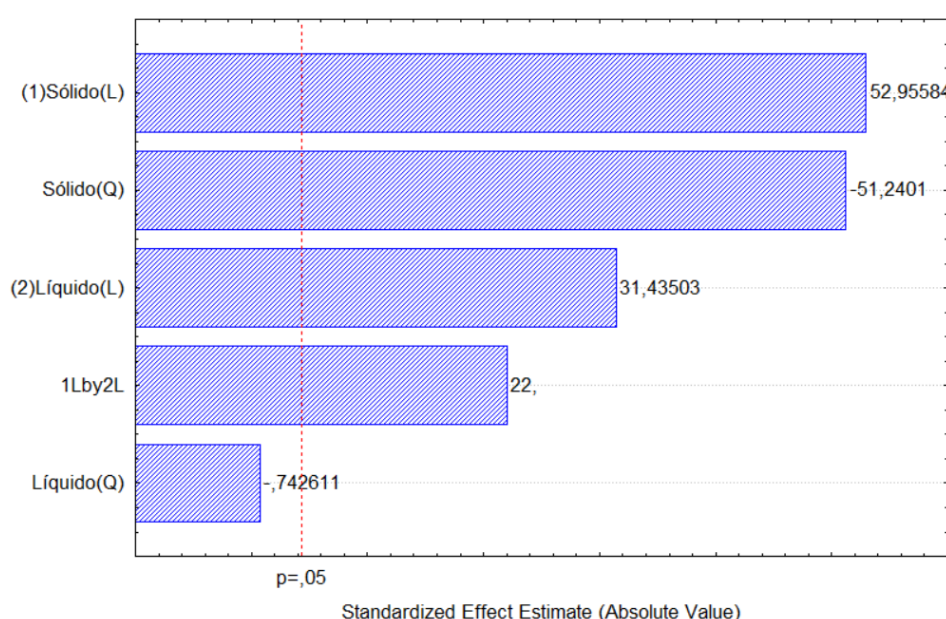
Onde, X_1 é concentração de sólido e X_2 concentração mistura das amilases

Tabela 43: Resultado do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR III para otimização da relação Sólido:Líquido

Experimentos	Componentes		Glicose (Y ₁ g/L)
	Sólido (x ₁)	Líquido (X ₂)	
1	-1 (38,70)	-1 (774,50)	122,70
2	-1 (38,70)	1 (1625,50)	118,10
3	1 (81,30)	-1 (774,50)	144,17
4	1 (81,30)	1 (1625,50)	207,06
5	-1,41 (30,00)	0 (1200,00)	78,22
6	1,41 (90,12)	0 (1200,00)	162,58
7	0 (60,00)	-1,41 (600,00)	157,98
8	0 (60,00)	1,41 (1800,00)	213,19
9 (C)	0 (60,00)	0 (1200,00)	184,05
10 (C)	0 (60,00)	0 (1200,00)	185,58
11 (C)	0 (60,00)	0 (1200,00)	182,52

Tabela 44: Análise de ANOVA do Delineamento Composto Central Rotacional do estudo da hidrólise (sólido:líquido) (DCCR III)

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p _{valor}
(1)Sólido (L)	6596,79	1	6596,789	2804,321	0,000356
Sólido (Q)	6176,26	1	6176,257	2625,551	0,000381
(2)Líquido (L)	2324,52	1	2324,516	988,161	0,001010
Líquido (Q)	1,30	1	1,297	0,551	0,535093
1L by 2L	1138,54	1	1138,545	484,000	0,002060
Lack of Fit	108,54	3	36,181	15,381	0,061663
Erro Puro	4,70	2	2,352		
Soma Total	16878,01	10			

**Figura 31:** Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR III) para otimização da relação Sólido:Líquido**Tabela 45:** Coeficiente de Regressão para a resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR III) para otimização da relação Sólido:Líquido

	Coeficiente de Regressão	Erro Puro	t ₍₂₎	p _{valor}
Média/interação	184,0491	0,885507	207,8461	0,000023
(1)Sólido (L)	28,7158	0,542260	52,9558	0,000356
Sólido (Q)	-33,0713	0,645418	-51,2401	0,000381
(2)Líquido (L)	17,0460	0,542260	31,4350	0,001010
Líquido (Q)	-0,4793	0,645418	-0,7426	0,535093
1L by 2L	16,8712	0,766871	22,0000	0,002060

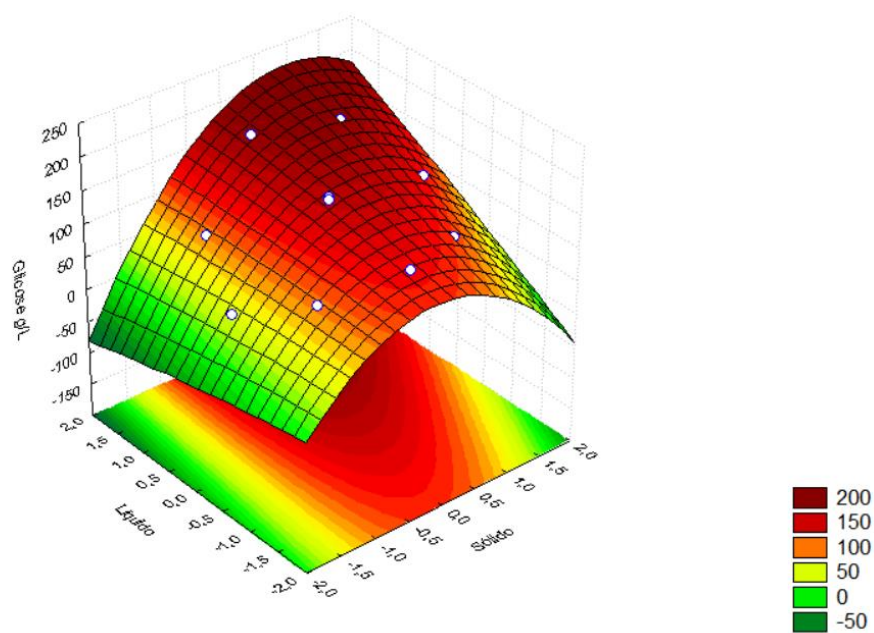


Figura 32: Superfície de resposta do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR II) para otimização da relação Sólido:Líquido

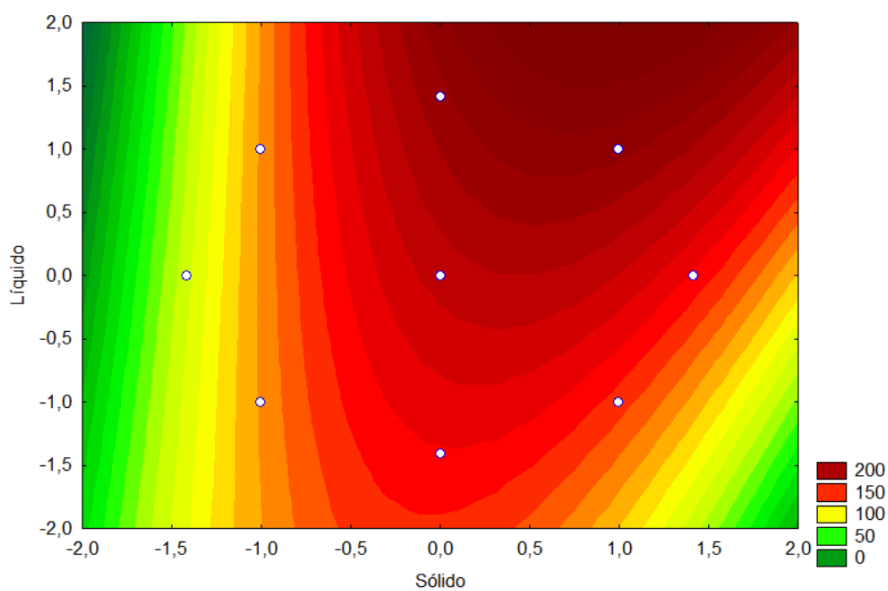


Figura 33: Curva de contorno Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR III) para otimização da relação Sólido:Líquido

5.5 Hidrólise de Fécula de Mandioca

Na figura 34, está apresentado o gráfico do perfil cinético da hidrólise do substrato pelas amilases recombinantes concentradas que foi realizada através das condições ótimas propostas pelo método utilizado neste estudo. A partir de 38^a hora o sistema já assinala a conversão total do substrato disponível no meio em glicose.

Com o objetivo de avaliar o desempenho da mistura otimizadas das amilases recombinantes foram realizados experimentos de hidrólise enzimática da fécula de mandioca. Para um volume de 400 mL de mosto com carga de fécula em 183,24 g (45,81% (g/g)) e cargas enzimáticas de 5895,5 U (1859,9 μ L) de α -amilase e 67,51 U (1649,16 μ L) de glicoamilase. Pode-se verificar que a hidrólise desse substrato levou a liberação de 174,25 g/L de glicose com 24 horas de processo e concentração máxima ao final das 48 horas de 330 g/L de glicose, valor que corresponde a eficiência de hidrólise de 89,36%. Ao experimento controle não foi adicionado a mistura das amilases, sendo o volume de enzima substituído por tampão, e como o esperado não apresentou liberação de glicose.

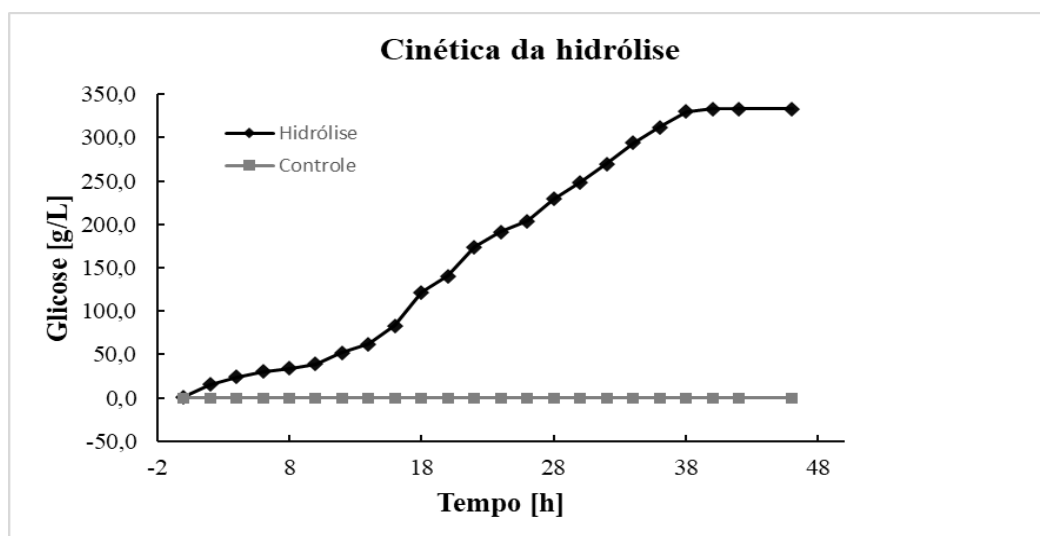


Figura 34: Perfil cinético da eficiência de hidrólise da fécula de mandioca utilizando amilases recombinantes

5.6 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado em fermentômetros para obtenção de álcool utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

A fermentabilidade dos açúcares liberados pela hidrólise utilizando as amilases recombinantes otimizadas e concentradas, foi avaliada nesta etapa, a figura 35 está representado o perfil cinético da produção de etanol equivalente produzido no sistema de fermentômetro, onde o valor apresentado é estimado estequiometricamente pela liberação de CO₂.

A concentração de etanol equivalente apresentada foi de 75,47 g/L. Considerando que no meio estava presente 183,24 g/L de fécula de mandioca, com 90,8% de amido em sua composição, não esquecendo do fator de correção 1,11 está relacionado à adição de uma molécula de água (18 g/mol) para liberação de uma molécula de glicose (180 g/mol), para cada ligação covalente rompida durante a hidrólise do amido segundo BARCELOS (2010), sendo assim atinge-se uma concentração teórica de 184,68 g/L de glicose. Com essa concentração, o valor máximo teórico de etanol, poderia ser de 92,34 g/L. O valor de etanol equivalente apontou uma eficiência de fermentação de 81,73%.

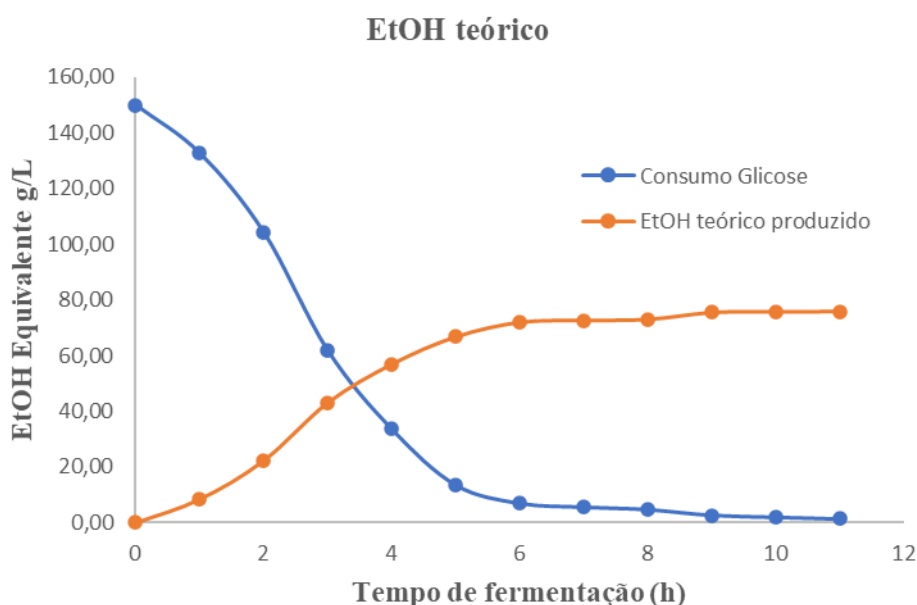


Figura 35: Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado das amilases recombinantes de fécula de mandioca, em fermentômetro, utilizando levedura comercial

5.7 Determinação do Teor de Etanol

A fermentação conduzida com *Saccharomyces cerevisiae* comercial, teve completa conversão dos açúcares redutores após 10 h. A análise cromatografia gasosa constatou, que o álcool produzido do hidrolisado de fécula de mandioca pelas enzimas amilolíticas recombinantes concentradas, tinha uma concentração de 64,62 g/L correspondendo a 86% de conversão e com isso uma produtividade volumétrica (Q_p) do processo fermentativo foi igual a $6,46 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, valores observados no (ANEXO 1), com essa concentração chegou-se ao equivalente a um rendimento produto substrato ($Y_{p/s}$) de $0,431 \text{ g g}^{-1}$. E eficiência fermentativa de 86,16%. Cinelli (2012) utilizando amido granular de milho obteve um teor de 59,15 g/L. Correa (2015) chegou a concentrações entre 43,9 e 45,7 utilizando quirera de arroz. Gonçalves (2016) fermentando torta e farelo da mandioca 64,50 g/L, assim como Silveira (2020) fazendo a conversão de casca de banana a concentração de 30,99 g/L de etanol (Tabela 46). Levando em consideração os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se notar que a eficiência de conversão da fécula de mandioca em etanol está equivalente aos valores concernidos na literatura, comprovando assim a eficiência da otimização dos meios otimizados para produção das amilases recombinantes utilizadas para a hidrólise da fécula de mandioca. Muitos são os estudos realizados em busca de novas matrizes energéticas amiláceas, porém a grande maioria ainda utiliza enzimas comerciais para a hidrólise de seus amidos. A tabela 47 traz os resultados de forma resumida da análise do álcool de amido produzido utilizando as amilases recombinantes produzidas pelos meios otimizados e concentrados. Apesar os testes tenham sido realizados somente com a fécula de mandioca como matéria-prima, tem-se um processo de produção de etanol e possivelmente uma série de diversos outros produtos, a partir de diversas matérias-primas amiláceas.

Tabela 46: Tabela comparativa de teores alcoólicos obtidos em outras pesquisas

Autor (Ano)	Substrato	Teor obtido (g/L)
CINELLI (2012)	Amido granular	59,15
CORREA (2015)	Quirera de arroz	43,9 e 45,7
GONÇALVES (2016)	Torta e farelo da mandioca	64,5
SILVEIRA (2020)	Casca de banana	30,999
ARAÚJO (2021)	Fécula de mandioca	64,62

Tabela 47: Resumo com os dados da produção do etanol

	Fermentômetro
	CG
Produtividade Volumétrica (g.L⁻¹.h⁻¹)	6,46
Eficiência de Fermentação (%)	86
Fator de Rendimento de Produção de Etanol Y(P/S) (g/g)	0,431
Redução Percentual de Substrato (RPS)(%)	100
Concentração Inicial de Glicose (g/L)	150
[EtOH] g/L *	64,62
Tempo Fermentado (h)	10

6. Conclusão

Neste trabalho onde foi proposto realizar a otimização dos meios de cultivo da produção de amilases recombinantes (α -amilase e glicoamilase) para hidrólise de amido de mandioca visando produção de etanol pelos resultados obtidos, pode-se concluir que os objetivos do mesmo foram alcançados:

- ✓ As enzimas amilolíticas recombinantes de *Bacillus licheniformis* (α -amilase) e *Aspergillus awamori* (glicoamilase) ambas expressas em *Pichia pastoris* GS115, apresentaram necessidades peculiares dentre as fontes de nitrogênio avaliadas.
- ✓ Dentre as fontes de nitrogênio avaliadas, o extrato de levedura foi o de maior importância para a produção de ambas amilases recombinantes.
- ✓ As condições ótimas das concentrações das fontes de nitrogênio para α -amilase foram de 23,44 g/L de extrato de levedura e 1,06 M de tampão fosfato. Para a glicoamilase se deu em 23,22 g/L de extrato de levedura e 21,24 de biotina.
- ✓ A otimização das fontes de nitrogênio através do uso da metodologia de planejamento experimental foi bem sucedida, haja visto que se obtivera as concentrações ótimas de nitrogênio para as duas atividades amilolíticas. Com o uso dessa metodologia que apresenta sensibilidade e exatidão adequadas, possibilitou eliminar dos meios a ureia das duas enzimas e a peptona no meio da glicoamilase fazendo com que os custos relacionados com o preparo do meio sejam reduzidos.
- ✓ As enzimas, através do meio otimizado, apresentaram capacidade de hidrolisar a fécula de mandioca quando produzidas nos meios otimizados para fins de produção de álcool.
- ✓ Os modelos matemáticos revelados no estudo da hidrólise para proporção para obtenção do *blend* das enzimas que mostrou a composição de 53% de α -amilase e 43% de glicoamilase. Para a proporção substrato:*blend* chegou-se ao valor de concentração de substrato de 45,81% para o volume de 877,59 L de *blend* no meio se mostraram eficiente.
- ✓ A hidrólise enzimática utilizando as amilases recombinantes apresentou conversão de amido em glicose com 89,36% de eficiência levando em

consideração o teor de amido presente na fécula sendo 90,80% e a concentração de sólidos no meio sendo de 183,24 g/L.

- ✓ A fermentação alcoólica, do hidrolisado, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* após 10 horas de processo fermentativo apresentou produtividade volumétrica Q_p de 6,46 g L⁻¹h⁻¹, eficiência fermentativa de 84,34%, fator de rendimento ($Y_{P/S}$) em substrato consumido de 0,431 gg⁻¹ e obteve concentração de 64,62 g/L de etanol correspondendo a 86% do etanol equivalente.
- ✓ As enzimas concentradas continuam a apresentar estabilidade após 12 meses de estocagem sob refrigeração em temperatura de 8 (± 3 °C) e 22 (± 4 °C) em prateleira. Sendo que a α -amilase não apresentou perda de atividade enzimática e a glicoamilase perdeu aproximadamente 20% nas duas formas de armazenamento, ressaltando que não foi adicionado nenhum estabilizante nas mesmas, o que indica boa estabilidade sendo assim adequadas para serem utilizadas em bioprocessos.

7. Sugestões

- ✓ Realizar o escalonamento da produção das enzimas;
- ✓ Comparar o método de concentração por rotaevaporação;
- ✓ Estudar a possibilidade da utilização das enzimas em forma isolada;
- ✓ Avaliar a utilização das amilases em outras fontes amiláceas;
- ✓ Verificar integração das duas enzimas num mesmo microrganismo;
- ✓ Utilizar linhagens industriais de *S. cerevisiae* no processo fermentativo
- ✓ Testar fermentação em escala piloto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM, 2014. Álcool de mandioca atrai investimentos. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, 13 (www.abam.com.br). Acesso: 26/11/2018.

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

ARAÚJO, F. das C. B. de. Estudo de acessos de mandioca do Banco Ativo de Germoplasma da Amazônia Oriental por meio de descritores quantitativos e marcadores moleculares SNP. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA.

ARAUJO, L. L. 2012. *Processo de hidrólise de amido utilizando amilases recombinantes para a produção de etanol*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 70pp.

ASTOLPHO, H. A. 2012. *Clonagem e expressão heteróloga do gene codificante da α -Amilase de Bacillus licheniformis DSM13 em Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 82pp.

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

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

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

BARROS NETO, Benício de; Ieda Spacino Scarminio; Roy Edward Bruns Como fazer experimentos: pesquisas e desenvolvimento na ciência e na indústria – 4 ed. Porto Alegre: Brookman, 2010.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K M.; DUGGAR, A.; DEY, K.; PANDEY, A S.. Industrial Enzymes - Present status and future perspectives for India. *Journal Of Scientific & Industrial Research*. India, p. 271-286. maio 2013.

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

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. and HUNTER, J. S. Statistics for experimenters – an introduction to desing, data analysis and model building. New York: Jonh Wiley e Sons, 1978.

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

CAMILI, E. A. Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir da polpa de mandioca. 2010.

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

CARMO, E. J 2010. *Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de Aspergillus awamori em Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 118pp.

CARVALHO, F. S. 2012. *Clonagem de α -amilase em S.cerevisiae por δ -integração e caracterização parcial dos clones*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 71.pp.

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

CENBIO, 2012 Amiláceos – disponível em: <http://cenbio.iee.usp.br/saibamais/bancobiomassa/vegetaisnaolenhosos/amilaceos.htm> acesso em jun/2020.

CEREDA, M. P. Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais, 1996.

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

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

CINELLI, Bernardo Alves. Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial. 2012. 200 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

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

CONAB. Análise mensal da Mandioca. Abril, 2019.

CORREA, F.F.De B. Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por rhizopus oligosporus e etanol por saccharomyces cerevisiae.

2015. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2015.

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

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

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

DEL BIANCHI, V. L. Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo. Balanços de massa e energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo, 1998.

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

EPE – Empresa de Pesquisa Energética 17/07/2018. [On-line] disponível em <http://www.canalbioenergia.com.br/cenario-de-oferta-e-demanda-de-etanol/>

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

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

FILHO, W.G.V; MENDES, B.P., Fermentação alcoólica de raízes tropicais. Série: Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Volume 3 : Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, Capítulo 19, p. 530-575. Setembro de 2003.

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

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

GONÇALVES, L.G. produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* E hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por

Saccharomyces cerevisiae. 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2016.

GÖRGENS JF, Bressler DC, van Rensburg E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for direct conversion of raw, uncooked or granular starch to ethanol. *Crit Rev Biotechnol*. 2015;35:369–91

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

GUANZIROLI, C. Mercados viáveis para a inserção econômica dos agricultores familiares. In: CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. A pequena produção rural e as tendências do desenvolvimento agrário brasileiro: ganhar tempo é possível? Brasília, DF, 2013. p. 101-132.

GUERRA O. G. Rubio I. G, da Silva Filho C. G, Bertoni R. A, Dos Santos Govea R. C, Vicente E. J. 2006 .A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *J. Microbiol. Methods*. 67:437-45.

GUERRAND, David. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *Ocl*, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 403-410, 30 jun. 2017. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2017031>.

HOMMES F. A., Mechanism of the Crabtree Effect in Yeast Grown with Different Glucose Concentrations I, Department of Biochemistry, University of Nijmegen School of Medicine, Nijmegen, The Netherlands Received June 16, 1965, *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 113, 324-330 (1966)

HONORATO Andressa C.; MACHADO Jocasta M.; CELANTE Gizele; BORGES Wesley G. P.; DRAGUNSKI Douglas C.; CAETANO Josiane, 2015. Biossorção de azul de metileno utilizando resíduos agroindustriais, *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* vol.19 no.7 Campina Grande. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n7p705-710>

HONZATKO, R.B; Aleshin, A.E., Hoffman, C., Firsov, L.M. Refined crystal structures of glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100. (1994) *J Mol Biol* 238: 575-591 IBGE. Dados agronômicos da mandioca. Brasil. 2019.

INGLIS, D., Kelly, J., van Dyk, S., Dowling, L., Pickering, G., & Kemp, B. (2020). *Saccharomyces uvarum* yeast isolate consumes acetic acid during fermentation of high sugar juice and juice with high starting volatile acidity. *OENO One*, 54(2). <https://doi.org/10.20870/oenone.2020.54.2.2594>

INVITROGEN (Pichia Expression Kit: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in Pichia pastoris - Catalog no. K1710-01

JARDINE, José Gilberto. Indicações de aspecto tecnológico sobre o bioetanol de matéria-prima amilácea. / José Gilberto Jardine, Mariana Rodrigues Peres, Ivanilde Dispatto. – Campinas, SP : Embrapa Informática Agropecuária, 2009.

JUJJAVARAPU, Satya E.; DHAGAT, Swasti; *Evolutive Trends in Industrial Production of α -amylase*, Bentham Science Publishers, 2019.

KEHAROM, S., MAHACHAI, R., CHANTHAI, S. The optimization study of α -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method, *International Food Research Journal* 23(1): 10-17 (2016)

LAGZOULI Mohamed, YOUSSEFI El Kettani, AITOUNEJJAR Ali, ELYACHIOUI Mohamed, JADAL Mohamed, Application of Response Surface Methodology for Optimization of Extracellular Glucoamylase Production by *Candida guilliermondii*, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2017.

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

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

Link para matéria: <https://www.nexojornal.com.br/grafico/2018/06/06/A-produ%C3%A7%C3%A3o-o-consumo-e-o-pre%C3%A7o-do-petr%C3%B3leo-no-mundo-ao-longo-dos-anos>

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

LOKKO, Y.; HEIJDE, M.; SCHEBESTA, K.; SCHOLTÈS, P.; VAN MONTAGU, M.; GIACCA, Mauro. Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. *New Biotechnology*, [S.L.], v. 40, p. 5-10, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.005>.

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

MACHIUS, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G., Activation of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through a disorder-->order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. (1998) *Structure* 6: 281-292

MAGALHÃES O.P.; Souza M.P. 2010. Application of Microbial Amylase in Industry – A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, (41): 850-861.

MAPA. Anuário Estatístico da Agroenergia 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. 2010.

MARTINEZ, D. G.; FEIDEN, A. Potencial do resíduo do processamento da mandioca para produção de etanol de segunda geração. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.6, n.2, p. 141-148, 2017

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

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

MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied biochem* 31:135 – 152, 2000.

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

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

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

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

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. *Princípio de bioquímica*. Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W. R. N. São Paulo: Ed. SARVIER, 5a ed., 839p., 2011. New Delhi: *Asiatech Publishers*, 1 ed., Inc, p. 760, 2005.

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

OLIVEIRA, C. M. 2010. *Bacillus* de solos do estado do Amazonas produtores de alfa-amilase. Monografia de Curso de Graduação, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 61pp.

OLIVEIRA, L. A. de; SANTOS, L. F. dos; OLIVEIRA, E. J. de; SILVA, D. J. da *COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ACESSOS DE MANDIOCA DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA*, 2015.

OLIVEIRA, T. S. 2009. *Clonagem e expressão do gene que codifica alfa-amilase de Bacillus licheniformis em Bacillus subtilis*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-

Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 91pp.

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

OTSUBO, A. A.; FARIAS, A. R. N. Cultivo da Mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. 2002.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C. R., SOCCOL, V. T. SINGH, D. and PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology.

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, K. N.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T.. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. Bioresource Technology. Thessaloniki - Grécia, p. 123317-123328. ago. 2020.

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

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

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

PRASAD, S.; ROY, I.. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. Recent Patents On Biotechnology, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 33-56, 22 dez. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1872208311666170612113303>.

ROCHA, C. P., Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido, Dissertação (Mestrado) programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia., 2010.

ROY JK, Borah A, MAHANTA CL, MUKHERJEE AK. Cloning and overexpression of raw starch digesting α -amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant α -amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and baking industry. J Mol Catal B Enzym. 2013;97:118–29.

SAITO, I.; CABELO, C.; FUKUSHIMA, R. S. Caracterização das fibras do farelo de

mandioca residual após tratamento hidrotérmico. Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2006.

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

SANTOS, A. F. dos; GANDRA, R. M.; OLIVEIRA, S. S. Carvalho de; KNEIPP, Lucimar F.; D'AVILA-LEVY, C. M.; SODRÉ, C. L.; BRANQUINHA, M. H.;

SANTOS, A. L. S. dos. PEPTIDASES EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO. In: RESENDE, Rodrigo R.. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria. São Paulo: Blucher, 2016. p. 379-487.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. Journal Of Bioprocessing & Biotechniques, [S.L.], v. 1, n. 01, p. 1-10, 2012. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.s4-002>.

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

SILVEIRA, P.R.N. da. Uso da α -amilase na produção de etanol a partir de resíduos da casca de banana. 2020. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2020.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K.. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 1-15, 19 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.

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

SOUZA, Everton Diel Rede de seleção e manejo fitotécnico da mandioca açucarada para a produção de etanol em áreas de mata alterada no Norte da Amazônia, 2014.

SOUZA, F. R. 2011. *Produção de amiloglucosidase por Aspergillus niger em meios contendo Iponema batatas (L) Lam (batata-doce)*. Tese de Doutorado. Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 162pp.

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

SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido, 2005. Dissertação (Tecnologia de Alimentos,

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2005.

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

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

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

UNICA. Produção de etanol do Brasil. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>: Acesso em Dez. 2011. 2011.

VENTURINI FILHO W. G., BRUNELLI, L. T., TONIATO J., NOJIMOTO T., NOVAES F. V., método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica Curitiba, v. 31, n. 2, p. 227-236, jul./dez. 2013 DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v31i2.34845>

VERÇOSA, J. V.M. 2013. Genetic transformation to integrate two expression. Cassetts into the genome of yeast *Pichia pastoris*. In: V Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2013, Florianópolis, SC. V Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 233.

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

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

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

XU, Qiang-Sheng; Yu-Si Yan and Jia-Xun Feng Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum* *Biotechnol Biofuels* (2016) 9:216

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

ANEXO1

LAUDO TÉCNICO**N. ° 102/2020**

**ANÁLISE DO TEOR DE ETANOL EM AMOSTRAS
DE FERMENTADO**

Solicitante:

LANNA LOBO

Analista Responsável: Sergio Duvoisin Junior
CRQ: 14101990

LAUDO TÉCNICO**Nº 102/2020**

Data de início do serviço:
12 de março de 2020.

I – Caracterização do Pedido de Laudo Técnico:**Solicitante:**

Lanna Lobo

Natureza do Exame:

Determinação do teor de etanol em amostra de fermentado.

Produto:

Fermentado alcoólico

Quantidade:

3 amostras

Identificação das Amostras:

Amostra 1

Amostra 2

Amostra 3

II – Coleta e Amostragem:

A coleta das amostras foi realizada pela solicitante do presente laudo, e foram entregues no dia 09 de março de 2020 em frasco tipo Falcon com tampa e parafilm com, aproximadamente, 5 mililitros da amostra.

III – Ensaios Realizados:

As análises qualitativa e quantitativa das amostras foram realizadas através da técnica de cromatografia em fase gasosa com detector FID e Headspace.

A análise qualitativa, com relação ao etanol, foi realizada pela comparação dos tempos de retenção do padrão de etanol com as amostras analisadas, bem como pela técnica de adição de padrão.

A análise quantitativa foi realizada pela técnica de padronização externa do padrão de etanol.

IV - Materiais Utilizados:

Cromatógrafo em Fase Gasosa Shimadzu:

Coluna: SH-Rtx-1 (30m x 0,32mm x 0,25mm) Shimadzu

Balança Analítica;

Vidrarias Diversas;

Padrão de Etanol Absoluto: Merck EMSURE – ACS, ISO, Reag. Ph Eur;

V – Análise dos Resultados:

A curva analítica foi feita com a média de três injeções de cada concentração dos padrões de etanol, sendo que o gráfico 1 obtido está apresentado abaixo:

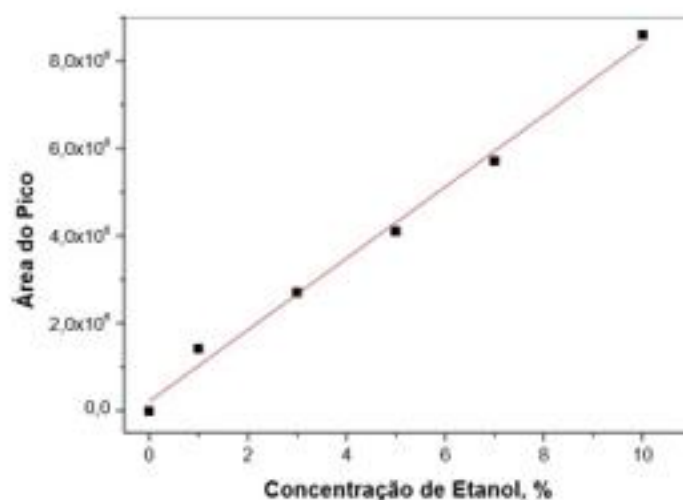


Gráfico 1 – Curva Analítica de Etanol

A curva obtida com os resultados experimentais é descrita pela equação da reta: $y = 214974,80327 + 817437,0595 \cdot x$, com coeficiente de correlação igual a 0,991.

A partir dos resultados obtidos foi possível calcular a concentração de etanol na amostra analisada, o resultado esta abaixo apresentado:

Amostra	Média das Áreas	Concentração, % (v/v)
Amostra 1	6907501	8,19
Amostra 2	6728034	7,97
Amostra 3	6648763	7,87

NOTA: O resultado contido neste documento têm significação restrita, e se aplicam somente às amostras ensaiadas.

Manaus, 12 de março de 2020.



Sergio Duvoisin Junior
CRQ - 14101990