

ESTUDO CINÉTICO E FERMENTATIVO DO AMIDO DE MANDIOCA

Luiz Henrique Urbano¹, Emerson Loli Garcia², Magali Leonel³, Cláudio Cabello⁴,

1 Assistente de Suporte Acadêmico no Centro de Raízes e Amidos Tropicais. E-mail: luizhu@cerat.unesp.br

2 Aluno de doutorado em Agronomia, FCA/UNESP, Botucatu-SP. E-mail: emerson.cerat@gmail.com

3 Pesquisadora do Centro de Raízes e Amidos Tropicais, UNESP, Botucatu-SP. E-mail: mleonel@cerat.unesp.br

4 Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências, Bauru. E-mail: cabello@fc.unesp.br

1 RESUMO

O amido é uma importante matéria prima industrial extraindo-se anualmente cerca de 60 milhões de toneladas em todo o mundo. Uma importante aplicação do amido é como fonte alternativa de energia, destacando-se a produção de etanol a partir do amido de mandioca. No Brasil, crescente demanda ressurgiu com a produção de veículos biocombustíveis e incentivos governamentais. Devido à importância energética do amido o presente trabalho objetivou hidrolisar e avaliar a cinética da fermentação alcoólica do amido de mandioca através da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa Y 904. Os resultados evidenciaram que o tratamento contendo 180 g L⁻¹ de glicose demonstrou o melhor rendimento (94 % m/m). Contudo, o tratamento contendo 260 g L⁻¹ de glicose, após 10 h de fermentação, apresentou glicose remanescente no processo e sob baixas concentrações de glicose a levedura demonstrou ser mais eficiente. Com base na viabilidade celular a cepa Y 904 demonstrou necessitar de maior tempo para completar a conversão do substrato.

Palavras-chave: *Saccharomyces*; fermentação; *Manihot esculenta* Crantz; etanol.

KINETIC AND FERMENTATIVE STUDY OF CASSAVA STARCH

2 ABSTRACT

Starch is an important industrial raw material by extracting annually 60 million tons worldwide. An important application of the starch is as energy alternative source, standing out ethanol production from cassava starch. In Brazil demand growing resurfaced with the production of flex-fuel vehicles and government incentives. Due of the energetic importance the starch this study aimed hydrolyze and evaluate the kinetic of the alcoholic fermentation of the cassava starch by yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain Y 904. The results showed that treatment with 180 g L⁻¹ glucose showed the better yield (94 % m/m). However, in

treatment with 260 g L⁻¹ glucose, after 10 hours of the fermentation start, it was found, still, glucose in the process and under low glucose concentration, the yeast proved to be efficient more. Based in cell viability strain Y 904 showed need more time to complete the conversion of the substrate.

Keywords: *Saccharomyces*; fermentation; *Manihot esculenta* Crantz; ethanol.

3 INTRODUÇÃO

Utilizada em larga escala, a energia está fundamentalmente ligada a diversos setores de atividades. Em sua totalidade proveniente do petróleo, fonte não renovável, além de causar grandes impactos ambientais é uma fonte finita por não haver obtenção suficiente ao tempo de consumo. Dentre esse cenário, novas estratégias de produção de energia são necessárias e estão sendo consolidadas para o desenvolvimento econômico e sustentável do planeta.

Neste sentido os biocombustíveis são excelentes alternativas, pois, podem ser obtidos a partir de qualquer biomassa que tenha quantidades significativas de carboidratos, particularmente amido, que será convertido através de processo enzimático em substrato para obtenção do biocombustível - bioetanol (JARDINE; PERES; DISPATO, 2009).

A mandioca é cultivada praticamente em todas as regiões de clima tropical do Mundo (HOWELER, 2002), sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial. A raiz é basicamente composta por água e carboidrato, sendo utilizada como principal fonte energética nos trópicos, não apenas em termos de subsistência, mas também industrial (FAO, 2011; AGUIAR et al., 2011).

Atualmente 70 % da produção mundial de etanol é utilizada como combustível oriundo do petróleo e da biomassa agrícola (ALFENORE et al., 2004). O Brasil se consolidou como maior produtor e consumidor do Mundo de etanol, devido ao aumento do número de veículos automotores e aos incentivos governamentais direcionados, nos últimos anos.

No Brasil existe crescente interesse em utilizar a biomassa e os resíduos agroindustriais para a produção de etanol, como é o caso do amido, farelo de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros, diminuindo os impactos ambientais e agregando valores a cadeia produtiva. Segundo Alves (2005), enquanto uma tonelada de cana produz 140 kg de açúcar com rendimento de 85 litros de etanol, uma tonelada de mandioca pode produzir até 104 litros. Historicamente, de acordo com Venturini Filho e Mendes (2003), o álcool de mandioca já foi fonte de subsistência energética no Brasil em períodos de grande dificuldade.

Frente ao exposto, sendo a mandioca uma importante fonte alternativa energética, o presente trabalho objetivou avaliar a cinética da produção de etanol a partir do hidrolisado de amido de mandioca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fonte amilácea e hidrólise enzimática

O amido comercial de mandioca foi utilizado como fonte amilácea para obtenção do substrato fermentescível e para o processo de hidrólise foram utilizadas as enzimas Liquozyme Supra 2.2X e Saczyme com atividade enzimática de 300 KNU g⁻¹ e 800 AGU mL⁻¹, respectivamente.

No processo de hidrólise enzimática, suspensão de 30 % m/m de amido foi condicionada a 60 rpm com a enzima Liquozyme Supra 2.2X a 90±3 °C durante 120 minutos. Posteriormente, o hidrolisado foi resfriado e submetido à ação da enzima Saczyme, condicionado a temperatura de 60±3 °C por 960 minutos, para obtenção do substrato fermentescível.

4.2. Determinação dos açúcares fermentescíveis

Os açúcares fermentescíveis foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) sob condições: coluna AMINEX HPX 42A, fase estacionária em chumbo, 300 x 7,8 mm; detector de índice de refração; água deionizada foi utilizada como fase móvel a taxa de 0,6 mL min⁻¹ de injeção a 80°C. A concentração dos açúcares foi determinada a partir de curvas padrões.

4.3. Processo de fermentação alcoólica

O substrato fermentescível obtido foi ajustado para as concentrações de 180 g L⁻¹; 220 g L⁻¹ e 260 g L⁻¹ de glicose livre, obtendo-se três tratamentos. Para início da fermentação o pH do substrato foi ajustado para 4,5 e adicionou-se a levedura *Saccharomyce cerevisiae* cepa Y 904, estabilizada e seca na concentração de 8 % m/m.

A fermentação foi realizada em sistema anaeróbico condicionado a injeção de ar de 37 mL min⁻¹, agitação orbital mecânica em 120 rpm e temperatura em 32 °C. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 horas de fermentação, centrifugadas a 12000 rpm e congeladas a -20 °C para avaliação do estudo cinético.

4.4. Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada em cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) sob condições: coluna AMINEX HPX 87H, fase estacionária em chumbo, 300 x 7,8 mm; detector de índice de refração; água deionizada como fase móvel a taxa de 0,8 mL min⁻¹ de injeção a 65°C. A concentração de etanol foi determinada a partir da injeção de padrão primário.

4.5. Determinação da viabilidade celular

Foi transferido 1 mL do substrato para balão volumétrico de 25 mL ajustando-se o volume. Em seguida, alíquota de 0,5 mL foi tomada e misturada a 9,5 mL de solução corante [azul de metileno (0,025 %), NaCl (0,9 %), KCl (0,042 %), CaCl₂.6H₂O (0,048 %), NaHCO₃ (0,02 %), glicose (1,0%)]. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Foram consideradas mortas as células com coloração azul e viáveis aquelas sem coloração. Não foram considerados brotos, flocos de células e pseudomicélio. A viabilidade e número total das células foram determinados conforme: Células viáveis (%) = número células não coradas x 100; Número total de células mL⁻¹ = N (número total de células presentes no quadrante médio) x 2,5 () x 10⁵ () x D (fator de diluição).

4.6. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ao nível de 0,05 de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características físico-químicas da matéria prima

A caracterização físico-química do amido é de extrema importância, pois a partir de sua constituição definem-se as melhores aplicações para cada tipo de segmento. Segundo Garcia et al. (2014) as concentrações dos constituintes são dependentes da fonte botânica, do método de extração utilizado e processo de purificação adotado.

Segundo a legislação brasileira, RDC n° 263 (BRASIL, 2005) um amido de mandioca com qualidade deve apresentar umidade máxima de 18 % m/m, acidez em mL de solução 1,5 v/m, mínimo de 80 % m/m de amido e 0,5 % m/m de resíduo mineral fixo. Os dados físico-

químicos obtidos para o amido de mandioca são demonstrados na Tabela 1 e encontra-se dentro dos padrões vigentes no país. Os constituintes menores encontram-se em percentual total abaixo de 2 % m/m , indicando elevada pureza da matéria prima. Amido com baixo grau de pureza poderia influenciar o processo de hidrólise, bem como, o aparecimento de substâncias indesejáveis que poderiam inibir a ação da levedura durante a fermentação.

Tabela 1. Média \pm desvio padrão das características físico-químicas do amido de mandioca.

Componente	g 100 g ⁻¹ (bu)
Umidade	13,65 \pm 0,15
Amido	97,44 \pm 0,33
Lipídios	0,23 \pm 0,03
Proteína	0,16 \pm 0,01
Açúcares solúveis totais	0,14 \pm 0,02
Cinzas	0,10 \pm 0,01
pH	5,91 \pm 0,05
Acidez*	0,50 \pm 0,05

* - mL de NaOH 1 mol L⁻¹; bu – base úmida.

5.2. Processo fermentativo

O processo adotado durante a hidrólise apresentou rendimento de cerca de 97 % m/m , este, superior aos rendimentos verificados na literatura para os métodos enzima/enzima e ácido/enzima (ABRAHAM; KRISHNASWAMY; RAMAKRISHNA, 1987; ULIBARRI; HALL, 1997; SORAPIPATANA; YOOSIN, 2011), demonstrando eficiência do processo hidrolítico e substrato necessário para o processo fermentativo.

O rendimento de etanol variou entre 0,78 % m/m a 10,63 % m/m , respectivamente para os tratamentos 180 g L⁻¹ e 260 g L⁻¹ (Tabela 2). Contudo, em menor concentração de glicose é observado melhor adaptação da cepa as condições do meio iniciando rapidamente o processo biossintético de conversão, quando comparado aos demais tratamentos. Como observado nas concentrações de 180 g L⁻¹ e 220 g L⁻¹ de glicose, não houve diferença em rendimento de etanol entre os tempos 6, 8 e 10 horas de fermentação. Já para o tratamento contendo 260 g L⁻¹ de glicose o melhor rendimento foi verificado com 8 horas após o início da fermentação.

De acordo com Lima, Basso e Amorim (2001) inúmeros fatores podem interferir na eficiência da fermentação, tais como: temperatura, pressão osmótica, pH, oxigenação, minerais, concentração da levedura e contaminação microbiana. Segundo observado por Leonel et al. (2015) tempos elevados de fermentação podem contribuir para a proliferação

de bactérias que modificam o pH do meio contribuindo para a minimização da produção de etanol. Tal observação, reportada pelos autores, corrobora com a ocorrência verificada para os tratamentos 180 g L⁻¹ e 220 g L⁻¹ em tempos acima de 6 h de fermentação.

Tabela 2. Produção de etanol influenciado pela interação tempo/concentração de glicose.

Tempo (h)	Concentração de glicose (g L ⁻¹)			C.V. (%) 8,47
	180	220	260	
0	0,00dA	0,00dA	0,00eA	
1	0,78cA	0,38bA	0,55eA	
2	0,40cB	3,79cA	3,83dA	
4	7,28bA	6,90bA	6,50cA	
6	8,12abA	8,80aA	8,78bA	
8	8,30abB	9,53aA	9,93abA	
10	9,06aB	9,69aB	10,63aA	

Médias seguidas por letras iguais minúsculas em coluna e maiúscula iguais em linha não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

Para o tratamento contendo 180 g L⁻¹ de glicose, a conversão biossintética apresentou seu ápice com 4h de fermentação atingindo percentual de 7,28 % m/m, ocorrendo a estabilização da produção de etanol após 6 h de trabalho com drástica redução de substrato. Concomitantemente, o percentual de glicose, que no início da fermentação era de 18 % m/m, nas primeiras horas de trabalho fermentativo decresceu para aproximadamente 8 % m/m, não ocorrendo alteração na concentração de etanol. Entretanto, a viabilidade celular incrementou consideravelmente ao nível de 57 % nas duas primeiras horas após inoculação, demonstrando que neste período a cepa Y 904 utilizou do consumo de substrato para aumentar o número de células viáveis, iniciando o processo fermentativo após a segunda hora de inoculação (Figura 1a).

Já para o tratamento com 220 g L⁻¹ de glicose a conversão em etanol apresentou início logo na primeira hora após a inoculação. Entretanto, o incremento de células viáveis aconteceu até a segunda hora, acumulando cerca de 3,5 x 10⁹ células viáveis por mL de substrato, sendo que a produção máxima de etanol, bem como a estabilização da conversão, ocorreu após 6 horas de fermentação, conforme demonstrado na Figura 1b.

O consumo de glicose, para o tratamento 260 g L⁻¹, apresentou-se constante durante todo o processo fermentativo, entretanto, após as 10 h de fermentação foi verificado a presença de açúcar fermentescível residual do processo (2,84 % m/m), indicando que a cepa Y 904 não concluiu completamente a bioconversão dentro o período avaliado. Possivelmente, esta ocorrência seja devida a transformações que o meio sofreu durante o

período de fermentação e/ou a existência de substâncias interferentes ao processo que podem ter reduzido a taxa metabólica da cepa Y 904.

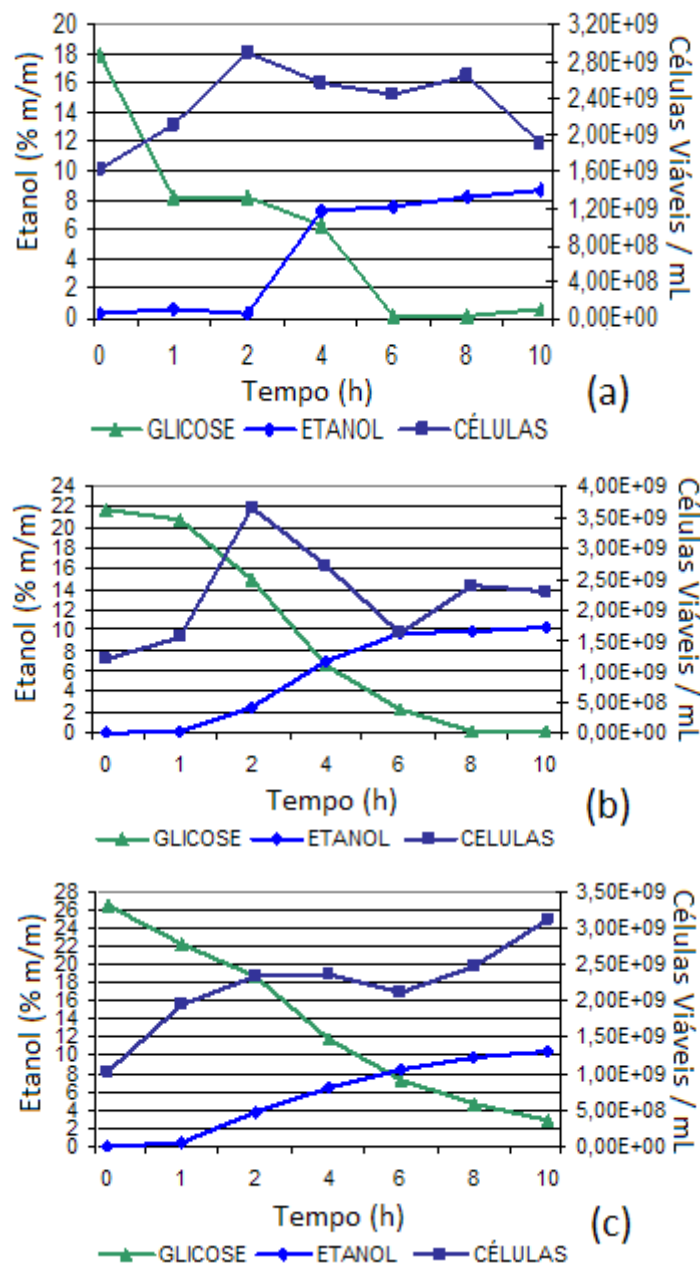


Figura 1. Concentração de glicose, etanol e levedura durante o período de fermentação. (a) Substrato com 180 g L⁻¹ de glicose; (b) Substrato com 220 g L⁻¹ de glicose; (c) Substrato com 260 g L⁻¹ de glicose.

A estabilização da produção de etanol ocorreu após 8 h da inoculação, contudo, a produção de células viáveis foi constante durante as primeiras 4 horas, caindo na sexta hora e voltando a crescer na oitava hora, atingindo $3,13 \times 10^9$ células viáveis por mL de substrato, conforme demonstrado na Figura 1c.

Dentre os tratamentos avaliados, conforme demonstrado na Tabela 3, foi possível observar melhor eficiência na bioconversão para o tratamento contendo 180 g L⁻¹ de glicose, bem como, o maior número de células viáveis, sendo este, responsável pela eficiência verificada. Entretanto, o hidrolisado contendo 260 g L⁻¹ de glicose apresentou o maior rendimento em produção de ETOH e a menor eficiência na bioconversão, possivelmente devido à dificuldade das células em se adaptarem ao meio, e por consequência, o menor índice de células viáveis por mL de substrato, influenciando o rendimento observado.

Tabela 3. Variáveis independentes após 10 h de processo fermentativo.

Tratamento	Etanol (g L ⁻¹)	Células Viáveis	Eficiência (% m/m)
180	86,60c	2,50 x 10 ⁹ a	94,0a
220	102,20b	2,28 x 10 ⁹ b	90,7b
260	104,10a	2,13 x 10 ⁹ b	87,3c

Médias seguidas por letras iguais em coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo observado, o tratamento contendo 180 g L⁻¹ apresentou eficiência superior a reportada por Srinorakutara et al. (2004) para hidrolisados oriundo do resíduo de amido de mandioca, hidrolisados com enzimas celulase e pectinase em um tratamento preliminar seguido pela utilização da α -amilase e amiloglicosidase. Entretanto, Jamai et al. (2007) verificaram rendimentos superiores aos observados na produção de etanol utilizando amido como substrato e levedura *Candida tropicalis* como agente fermentador.

Já utilizando a levedura *S. cerevisiae*, Mojovic et a. (2006) verificou eficiência bem inferior as observadas em farinha de milho hidrolisadas com enzimas α -amilase e amiloglicosidase. Os resultados reportados pela literatura especializada corroboram com os observados e a utilização da cepa Y 904 em nível industrial para a produção de etanol, utilizando como fonte de açúcares fermentescíveis o amido de mandioca.

6 CONCLUSÃO

O amido nativo de mandioca apresentou características físico-químicas que possibilitaram sua utilização como substrato para o processo de hidrólise, permitindo a obtenção suficiente de açúcares fermentescíveis para os tratamentos. Dentre o processo fermentativo o ápice foi obtido com 6 horas de inoculação em substrato contendo 180 g L⁻¹ de glicose, favorecendo o maior rendimento em etanol.

7 REFERÊNCIAS

ABRAHM, T. E.; KRISHNASWAMY, C.; RAMAKRISHNA, S. V. Effect of hydrolysis conditions of cassava on the oligosaccharide profile and alcohol fermentation. **Starch/Stärke**, v. 39, p. 237-240, 1987.

AGUIAR, E. B.; BICUDO, S. J.; CURCELLI, F.; FIGUEIREDO, P. G.; CRUZ, S. C. S. Épocas de poda e produtividade da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1463-1470, 2011.

ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; BENBADIS, L.; BIDEAUX, C.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; MOLINA-JOUVE, C.; GUILLOUSET, S. E. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n 5, p. 537-42, 2004.

ALVES, L.R.A. O mercado brasileiro e mundial de álcool e perspectivas para o álcool de mandioca. In.: IV Workshop sobre tecnologias em agroindústrias de tuberosas tropicais: mandioca. Centro de Raízes e Amidos Tropicais (Cerat), 2005. **IV Workshop sobre tecnologias em agroindústrias de tuberosas tropicais: Mandioca**, p. 22-29.

BRASIL. Resolução nº 263. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o “**Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**”. Diário Oficial da União. Poder Executivo. Brasília, DF. 23 de setembro de 2005.

FAO Agriculture. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION**, 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 2016.

GARCIA, E. L.; LEONEL, M.; CARMO, E. Z. do; PÁDUA, J. G. de. Batata cv Pirassu como matéria prima industrial. **Revista Energia na Agricultura**, v. 29, n. 3, p. 220-227, 2014.

HOWELER, R. H. Cassava mineral nutrition and utilization. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Ed.). **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CABI, p.115-147, 2002.

JAMAI, L.; ETTAYEBI, K.; EL YAMANI, J.; ETTAYEBI, M. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amilase. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2765-2770, 2007.

JARDINE, J. G.; PERES, M. R.; DISPATO, I. Indicações de aspecto tecnológico sobre o bioetanol de matéria-prima amilácea. **Embrapa Informática Agropecuária**, 2009. 23 p.

LEONEL, M.; TORRES, L. M.; GARCIA, E. L.; SANTOS, T. P. R. dos; MISCHAN, M. M. Production of alcoholic beverage from ginger: Study of fermentation process and final product quality. **British Journal of Applied Science & Technology**, v. 9, n. 4, p. 318-326, 2015.

LIMA U. A; BASSO, L. C; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: Lima, U.A. (Ed.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Blucher, São Paulo; 2001.

MOJOVIC, L.; NIKOLIC, S.; RAKIN, M.; VUKASINOVI, M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. **Fuel**, n. 85, p. 1750-1755, 2006.

SORAPIPATANA, C.; YOOSIN, S. Life cycle cost of ethanol production from cassava in Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 15, p. 1343-1349, 2011.

SRINORAKUTARA, T.; SUESAT, C.; PITIYONT, B.; KITPREECHAVANIT, W.; CATTITHAMMANIT, S. Utilization of wast from cassava starch plant for ethanol production. **The Joint International Conference on “Sustainable Energy and Environment (SEE)”**, p. 344-349, 2004.

ULIBARRI, R. L.; HALL, G. M. Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 21, p. 398-404, 1997.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação Alcoólica de raízes tropicais. In: Cereda, M. P. et al. (Coord.) **Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**, 2003. v. 3, cap. 19, p. 530-575.