



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MELAÇO DE SOJA
HIDROLISADO ENZIMATICAMENTE

Francielle Batista da Silva

UBERLÂNDIA - MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MELAÇO DE SOJA
HIDROLISADO ENZIMATICAMENTE

Francielle Batista da Silva

Orientadores:

Dr. Ubirajara Coutinho Filho

Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA - MG

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e saúde, pela força nos momentos de desânimo, pela misericórdia infinita e a perseverança que me trouxe até aqui. Por reafirmar a cada dificuldade: “Porque eu, o Senhor teu Deus, te seguro pela mão e te digo: Não temas, que eu te ajudo”. (Isaías 41, 13).

Aos meus pais, Maria Madalena e Edmundo, que muitas vezes abriram mão de seus desejos para que fossem realizados os meus, que sempre acreditaram que a educação é o maior tesouro que poderiam me deixar, que me acompanharam em todos os momentos com tanto amor. A minha irmã Tatielle e meu namorado Diego que me apoiaram sempre!

Aos orientadores Prof^o. Dr. Ubirajara Coutinho Filho e Prof^o. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro, pela paciência, dedicação e carinho durante a realização deste trabalho. A Prof^a. Dra. Vicelma Luiz Cardoso, que me adotou como uma mãe, me orientou e ensinou tantas coisas. A Prof^a. Dra. Míriam Resende pela colaboração, principalmente com os equipamentos.

Aos amigos da pós-graduação, Curt Max, Gustavo Otero e Thiago Xavier, que tantos conhecimentos e momentos agradáveis dividiram comigo. As amigas do NUCBIO, especialmente, Betânia Braz, Cida Barros e Nattácia Rodrigues que dividiram conhecimentos, sonhos, medos, sorrisos, lágrimas, bolo, béqueres e condensadores! Aos demais companheiros de laboratório: Carla, Mauri, Jana, Wilson Jr., Christiane, Wesley, Líbia, Rafael, Diego Lemos, Rui, obrigada!

Aos alunos de iniciação científica Farley Vieira e Mariana Queiroz, que tanto ajudaram na realização dos experimentos.

Aos funcionários da FEQUI, em especial Cléo, Roberta, Ione, Lúcia, Silvino e José Henrique.

Ao Programa de Pós-Graduação FEQUI.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os amigos, parentes, companheiros de laboratório e demais pessoas de meu convívio que torceram para que eu concluísse este trabalho.

*"O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.
O que Deus quer é ver a gente
aprendendo a ser capaz
de ficar alegre a mais,
no meio da alegria,
e inda mais alegre
ainda no meio da tristeza!
A vida inventa!
A gente principia as coisas,
no não saber por que,
e desde aí perde o poder de continuação
porque a vida é mutirão de todos,
por todos remexida e temperada.
O mais importante e bonito, do mundo, é isto:
que as pessoas não estão sempre iguais,
ainda não foram terminadas,
mas que elas vão sempre mudando.
Afinam ou desafinam. Verdade maior.
Viver é muito perigoso; e não é não.
Nem sei explicar estas coisas.
Um sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor."
A gente quer passar um rio a nado, e passa:
mas vai dar na outra banda é um ponto muito mais em baixo,
bem diverso do em que primeiro se pensou.
Viver nem não é muito perigoso?
Dói sempre na gente, alguma vez,
todo amor achável,
que algum dia se desprezou...
Qualquer amor já é um pouquinho de saúde,
um descanso na loucura."*

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – Soja	3
2.2 – Melaço de soja	7
2.3 – Hidrólise de açúcares do melaço de soja	10
2.4 – α-galactosidase	12
2.5 – Fermentação alcoólica	14
2.5.1 – Matérias-primas	14
2.5.2 – Microrganismos	18
2.5.3 – Bioquímica da fermentação alcoólica	19
2.5.4 – Fatores que influenciam na fermentação alcoólica	22
2.5.5 – Fermentação e hidrólise simultâneas	25
2.6 – Planejamento Experimental	26
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 – Materiais	28
3.1.1 – Melaço de soja	28
3.1.2 – Levedura	28
3.1.3 – Enzima	29
3.1.4 – Reator	29
3.2 – Metodologia	30
3.2.1 – Dosagem de Etanol	30

3.2.2 – Contagem de células	31
3.2.3 – Determinação de Açúcares totais	31
3.2.4 – Preparo de inóculo	33
3.2.5 – Cálculo de rendimento das fermentações	33
3.2.6 – Condução dos experimentos	34
3.2.7 – Testes preliminares e de concentração	34
3.2.8 – Planejamento Composto Central (PCC)	35
3.2.8.1 <i>Estudo da influência da concentração de melaço de soja e de inóculo em fermentações com Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.2.8.2 <i>Estudo da influência da porcentagem de enzima SM e da temperatura na geração de açúcares fermentescíveis a etanol</i>	37
3.2.8.3 <i>Estudo da influência da porcentagem de enzima SM, da concentração de inóculo e da temperatura na produção de etanol em fermentação e hidrólise simultâneas</i>	39
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Fermentação do melaço de soja diluído	42
4.1.1 Testes preliminares	42
4.1.2 Avaliação da influência da concentração de melaço de soja e de inóculo na produção de etanol	44
4.1.2.1 <i>Rendimento (Y_1)</i>	46
4.1.2.2 <i>Açúcares totais residuais</i>	49
4.2 Fermentação do melaço de soja hidrolisado	53
4.2.1 Hidrólise enzimática do melaço de soja	53
4.2.2 Fermentação do melaço de soja hidrolisado	57
4.2.2.1 <i>Teste de concentração para fermentação do melaço de soja hidrolisado</i>	57
4.2.2.2 <i>Avaliação da influencia da porcentagem de enzima StarMax AGSL (SM) e da temperatura do processo de hidrólise na produção de etanol em pH 4,5</i>	60
<u>4.2.2.2.1 <i>Rendimento</i></u>	61

<i>4.2.2.2.2 Açúcares totais residuais</i>	65
<i>4.2.2.3 Avaliação da influência da porcentagem de enzima StarMax AGSL (SM) e da temperatura do processo de hidrólise na produção de etanol em pH 5,5</i>	68
<i>4.2.2.3.1 Rendimento</i>	69
<i>4.2.2.3.2 Açúcares totais residuais</i>	72
4.3 Hidrólise e Fermentação simultâneas (HFS)	77
4.3.1 Teste de concentração para o processo de hidrólise e fermentação simultânea (HFS) do melaço de soja	77
4.3.2 Avaliação da influência da porcentagem de enzima, da concentração de inóculo e da temperatura no processo de hidrólise e fermentação simultânea do melaço de soja ...	79
<i>4.3.2.1 Rendimento</i>	81
<i>4.3.2.2 Açúcares totais residuais</i>	86
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	89
5.1 – Conclusões	91
5.2 – Sugestões	92
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
CAPÍTULO 7 – ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Fig. 2.1	Evolução e estimativa da produção mundial de soja de 1961 a 2020.	3
Fig. 2.2	Evolução e estimativa da produção de soja na América do Sul de 1961 a 2020.	4
Fig. 2.3	Semente de soja, visão da borda (a) h=hilo; c=chalaza; m=micrópilo; hy=hipocotile; (b) visão lateral do grão de soja.	6
Fig. 2.4	Fluxograma da produção de farelo concentrado de soja (72% de proteína).	7
Fig. 2.5	Família dos oligossacarídeos da rafinose.	9
Fig. 2.6	Representação do mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas.	10
Fig. 2.7	Estruturas de sacarose, rafinose e estaquiose com as ligações glicosídicas que unem suas estruturas e as enzimas que hidrolisam as ligações: invertase e α -galactosidase.	11
Fig. 2.8	Esquema da reação catalisada pela α -galactosidase.	11
Fig. 2.9	Rotas tecnológicas para produção de etanol a partir de diferentes biomassas.	15
Fig. 2.10	Metabolismo dos carboidratos em <i>Zymomonas mobilis</i> .	19
Fig. 2.11	Seqüência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	21
Fig. 2.12	Potencial de estresse de <i>S. cerevisiae</i> durante fermentação alcoólica.	22
Fig. 3.1	Amostra de melaço de soja.	28
Fig. 3.2	Reator batelada modelo <i>B. Braun Biotech International</i> utilizado em ensaios de fermentação e hidrólise de melaço de soja.	29
Fig. 3.3	Esquema do processo de cromatografia mostrando a migração das bandas de dois componentes na coluna.	30
Fig. 3.4	HPLC Shimadzu modelo LC-20A Prominence utilizado nas análises de açúcar e etanol.	31
Fig. 3.5	Esquema da câmara de Neubauer.	31
Fig. 3.6	Leitura de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na câmara de Neubauer.	32
Fig. 3.7	Esquema dos processos e experimentos realizados para estudo da produção de etanol por melaço de soja.	32

Fig. 3.8	Etapas realizadas para estudo da produção de etanol por melaço de soja	34
Fig. 4.1	Perfis de consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol em função do tempo.	44
Fig. 4.2	Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para rendimento	48
Fig. 4.3	Distribuição dos resíduos para rendimento.	48
Fig. 4.4	Superfície de reposta e curvas de contorno para o rendimento em função das concentrações de melaço de soja e de inóculo.	49
Fig. 4.5	Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para açúcares totais residuais.	51
Fig. 4.6	Distribuição dos resíduos para açúcares totais residuais.	51
Fig. 4.7	Superfície de resposta e curva de contorno para açúcares redutores em função da concentração de melaço de soja e inóculo.	52
Fig. 4.8	Perfis cinéticos de estaquiose, rafinose e sacarose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 55° C e pH 4,5.	54
Fig. 4.9	Perfis cinéticos de glicose e frutose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 55° C e pH 4,5.	54
Fig. 4.10	Perfis cinéticos de estaquiose, rafinose e sacarose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 50° C e pH 4,5.	55
Fig. 4.11	Perfis cinéticos de glicose e frutose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 50° C e pH 4,5.	55
Fig. 4.12	Perfis cinéticos de estaquiose, rafinose e sacarose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 45° C e pH 4,5.	56
Fig. 4.13	Perfis cinéticos de glicose e frutose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 45° C e pH 4,5.	56
Fig. 4.14	Perfis cinéticos de substrato, etanol e crescimento celular em fermentação do melaço de soja hidrolisado enzimaticamente.	60
Fig. 4.15	Distribuição dos resíduos para rendimento.	63
Fig. 4.16	Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para rendimento.	63
Fig. 4.17	Superfície de reposta e curva de contorno em função da concentração de enzima e a temperatura para o rendimento da produção de etanol por melaço de soja em %.	64
Fig. 4.18	Valores preditos e valores experimentais para o modelo.	66
Fig. 4.19	Distribuição dos resíduos para a resposta açúcares residuais.	67
Fig. 4.20	Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de enzima e a temperatura para a concentração de açúcares residuais na	68

produção de etanol por melaço de soja.

Fig. 4.21	Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento.	71
Fig. 4.22	Valores experimentais e valores preditos para o modelo.	71
Fig. 4.23	Superfície de resposta e curva de contorno para resposta rendimento.	72
Fig. 4.24	Valores observados e preditos do modelo proposto para a resposta açúcares residuais.	75
Fig. 4.25	Distribuição dos resíduos para a resposta açúcares residuais.	75
Fig. 4.26	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcares totais residuais.	76
Fig. 4.27	Perfis cinéticos de substrato, etanol e crescimento celular em processo de fermentação e hidrólise simultâneas do melaço de soja.	79
Fig. 4.28	Valores experimentais e valores preditos para a resposta rendimento.	83
Fig. 4.29	Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento.	84
Fig. 4.30	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta rendimento.	85
Fig. 4.31	Valores observados e valores preditos para açúcares totais residuais.	88
Fig. 4.32	Distribuição dos resíduos para a resposta açúcares totais residuais.	88
Fig. 4.33	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta açúcares residuais totais.	89

LISTA DE TABELAS

Tab. 2.1	Principais usos do óleo refinado de soja e da lecitina de soja.	5
Tab. 2.2	Composição química da soja e seus componentes (Base seca).	6
Tab. 2.3	Composição média do melaço de soja.	8
Tab. 2.4	Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica.	24
Tab. 3.1	Valores utilizados no planejamento para as variáveis independentes.	36
Tab. 3.2	Matriz do PCC com valores originais e codificados das variáveis.	36
Tab. 3.3	Valores utilizados no planejamento para as duas variáveis independentes.	38
Tab. 3.4	Matriz do PCC utilizado para avaliar a influência da porcentagem de enzima e da temperatura na produção de etanol por melaço de soja hidrolisado.	38
Tab. 3.5	Valores utilizados no planejamento para as três variáveis independentes.	40
Tab. 3.6	Matriz do PCC utilizado para avaliar a influência da porcentagem de enzima, da concentração de inóculo e da temperatura na produção de etanol por melaço de soja em processo de hidrólise e fermentação simultânea.	40
Tab. 4.1	Resultados do teste preliminar de fermentações realizadas em diferentes diluições, onde AT_0 é a quantidade de açúcares totais iniciais (g/L), AT_f é a quantidade de açúcares totais finais (g/L) e Y_1 é o rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos (%) e Y_2 é o rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais iniciais, calculados conforme Equação 3.3 e 3.4, respectivamente.	42
Tab. 4.2	Dados referentes à fermentação do melaço de soja diluído na concentração de 333 g/L, pH 4,5, 30 g/L de inóculo e agitação de 500 rpm, onde AT = açúcares totais.	43
Tab. 4.3	Matriz do PCC realizado para avaliar a influência da concentração do melaço de soja e da concentração de inóculo no rendimento da produção de etanol por melaço de soja.	45
Tab. 4.4	Regressão múltipla para resposta rendimento.	46
Tab. 4.5	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.	47
Tab. 4.6	Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).	48
Tab. 4.7	Regressão múltipla para a resposta açúcares totais residuais.	50

Tab. 4.8	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta açúcares totais residuais.	50
Tab. 4.9	Análise de variância para a resposta açúcares totais ao final da fermentação (AT_f).	52
Tab. 4.10	Dados referentes às fermentações de melaço de soja hidrolisado em diferentes concentrações.	58
Tab. 4.11	Dados referentes à fermentação do melaço de soja hidrolisado enzimaticamente na concentração de 250 g/L, pH 4,5, 35 g/L de inóculo e agitação de 500 rpm, onde AT = açúcares totais.	59
Tab. 4.12	Variáveis utilizadas no PCC e suas respostas para o pH de 4,5.	61
Tab. 4.13	Regressão múltipla para rendimento.	62
Tab. 4.14	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.	62
Tab. 4.15	Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).	64
Tab. 4.16	Regressão múltipla para a concentração de açúcares totais residuais.	65
Tab. 4.17	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para açúcares totais residuais.	66
Tab. 4.18	Análise de variância para a resposta açúcares totais no final da fermentação (AT_f).	67
Tab. 4.19	Variáveis utilizadas no PCC e as respostas.	69
Tab. 4.20	Regressão múltipla para a resposta rendimento.	70
Tab. 4.21	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.	70
Tab. 4.22	Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).	72
Tab. 4.23	Regressão múltipla para a resposta açúcares totais residuais.	73
Tab. 4.24	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta açúcares totais residuais.	74
Tab. 4.25	Análise de variância para a resposta açúcares totais no final da fermentação (AT_f).	76
Tab. 4.26	Resultados do teste preliminar de fermentações e hidrólises simultâneas realizadas em diferentes diluições.	77
Tab. 4.27	Dados referentes à cinética de fermentação e hidrólise simultânea do melaço de soja.	78
Tab. 4.28	Matriz do PCC realizado para avaliar a influência da porcentagem de	81

enzima, concentração de inóculo e temperatura em fermentação e hidrólise simultânea na produção de etanol por melaço de soja.

Tab. 4.29	Regressão múltipla para rendimento de fermentação.	82
Tab. 4.30	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.	83
Tab. 4.31	Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).	84
Tab. 4.32	Regressão múltipla para rendimento de fermentação.	86
Tab. 4.33	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para açúcares residuais.	87
Tab. 4.34	Análise de variância para açúcares totais no final da fermentação (AT_f).	88

RESUMO

O melaço de soja é um co-produto da produção de farinha de soja concentrada. É rico em açúcares, sendo composto principalmente de sacarose, estaquiose e rafinose. Estaquiose e rafinose não são diretamente fermentescíveis a etanol, mas hidrolisados via enzimas podem ser metabolizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Neste trabalho estudou-se a produção de etanol por fermentação do melaço de soja em três situações: 1) produção de etanol a partir do melaço de soja “in natura” pela fermentação com *S. cerevisiae*; 2) a hidrólise enzimática do melaço de soja por enzimas a base de α -galactosidases e posterior fermentação com levedura *S. cerevisiae*; 3) produção de etanol por hidrólise enzimática e fermentação simultâneas do melaço de soja. Foram utilizados estudos preliminares de concentração, acompanhamento de fermentações para obtenção de perfis cinéticos, de acompanhamento da hidrólise e planejamentos compostos centrais (PCC) para cada situação. Os estudos de perfis cinéticos e os experimentos de PCCs ocorreram em um bioreator operado em batelada, com volume útil de 1,5 L. Os resultados mostraram que para a fermentação do melaço “in natura” a concentração de melaço de soja e de inóculo que maximizam o rendimento da fermentação alcoólica encontra-se entre 330 e 400 g/L e entre 30 e 45 g/L, respectivamente em um processo de 9 horas de duração. A faixa que minimiza a concentração de açúcares totais residuais encontra-se entre 180 e 250 g/L para melaço e entre 25 e 45 g/L para inóculo. Observou-se na hidrólise enzimática do melaço de soja que a melhor condição encontra-se entre 50 e 55° C e pH 4,5. As condições de hidrólise que maximizaram o rendimento da fermentação e a concentração de açúcares residuais foram avaliadas em pH 4,5 e 5,5 no processo de hidrólise. Para pH 4,5, a faixa aproximada de enzima correspondente ao máximo rendimento encontra-se entre 0,045 e 0,080% em relação ao peso do substrato. Para a temperatura, a faixa que maximiza o rendimento está entre 54,0 e 56,5°C. As faixas que minimizam a concentração de açúcares totais residuais foram compreendidas entre 0,045 e 0,07% para enzima e 54 e 57°C para temperatura. Para pH 5,5, notou-se que a região que aumenta o rendimento de fermentação está entre 0,035 e 0,055% para porcentagem de enzima e temperatura acima de 58°C e a região que minimiza a quantidade de açúcares residuais das fermentações está entre 0,045 e 0,07% de enzima SM e temperatura acima de 59°C. O tempo de hidrólise foi de 10 horas a 55°C e a fermentação do melaço hidrolisado estabilizou em 4 horas. Para o processo de hidrólise e fermentação simultâneas, o máximo de rendimento se encontra na faixa de 0,02 a 0,08% de enzima, 30 e 55 g/L de inóculo e entre 30 e 38°C de temperatura. O mínimo de concentração de açúcares residuais do processo se encontra na faixa de 0,02 a 0,05% de enzima, 35 e 50 g/L de inóculo e entre 32 e 36°C de temperatura. O melaço de soja se mostrou um substrato potencial para produção de etanol com levedura *Saccharomyces cerevisiae* em bioreator batelada nos três processos estudados: fermentação do melaço in natura, hidrólise enzimática e posterior fermentação e hidrólise e fermentação simultâneas.

Palavras-chave: Melaço de soja, etanol, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The soybean molasses is a by-product of soybean meal concentrate. It is rich in sugars, mainly composed of sucrose, raffinose and stachyose. Stachyose and raffinose are not directly fermentable to ethanol, but hydrolyzed by enzymes can be metabolized by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this work we studied the production of ethanol from molasses by fermentation of soybean molasses in three situations: 1) production of ethanol from soybean molasses "*in natura*" by fermentation with *S. cerevisiae*, 2) the enzymatic hydrolysis of soybean molasses by α -galactosidase and subsequent fermentation with yeast *S. cerevisiae*, 3) ethanol production by simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of soybean molasses. Preliminary studies were used for monitoring substrate concentration in fermentations to obtain kinetic profiles, monitoring of the hydrolysis compounds and central composite design (CCD) for each situation. Studies of the experiments and kinetic profiles of CCD occurred in a bioreactor operated in batch with a working volume of 1.5 L. The results showed that for the fermentation of molasses "*in natura*" the concentration of soybean molasses and inoculum that maximize the efficiency of fermentation is between 330 and 400 g / L and between 30 and 45 g / L, respectively a process of 9 hours. The range that minimizes the total residual sugar concentration is between 180 and 250 g / L molasses and between 25 and 45 g / L inoculum. We observed in the enzymatic hydrolysis of soybean molasses that the best condition is between 50 and 55 ° C and pH 4.5. The hydrolysis conditions that maximized the efficiency of fermentation and the concentration of residual sugars were evaluated at pH 4.5 and 5.5 in the hydrolysis process. For pH 4.5, the approximate range of enzyme corresponding to the maximum yield is between 0.045 and 0.080% on the weight of the substrate. For temperature, the track that maximizes the yield is between 54.0 and 56.5 ° C. The bands that minimize the concentration of total residual sugars were between 0.045 and 0.07% for the enzyme and 54 to 57°C temperature. For pH 5.5, it was noted that the region increases the yield of fermentation is between 0.035 and 0.055% for percentage of enzyme and temperature above 58°C and the region that minimizes the amount of residual sugar fermentation is between 0.045 and 0, SM 07% of enzyme and temperature above 59°C. The hydrolysis time was 10 hours at 55 ° C and hydrolyzed molasses fermentation stabilized in 4 hours. For the process of simultaneous hydrolysis and fermentation, the maximum yield is in the range from 0.02 to 0.08% enzyme, 30 and 55 g / L inoculum and between 30 and 38°C temperature. The minimum concentration of residual sugar is in the process range from 0.02 to 0.05% enzyme, 35 and 50 g / L inoculum and between 32 and 36°C temperature. Soybean molasses proved to be a potential substrate for ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae* in batch bioreactor in the three cases studied: fresh molasses fermentation, enzymatic hydrolysis and subsequent fermentation and simultaneous hydrolysis and fermentation.

Keywords: soybean molasses, ethanol, hydrolysis.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Entre as principais razões para o interesse pelos biocombustíveis estão: a preocupação com o aquecimento global, a dependência dos combustíveis fósseis, a dependência externa de petróleo, por razões de segurança; de suprimento ou impacto na balança de pagamentos. Além disso, o uso dos biocombustíveis tem intenção de minimizar os efeitos das emissões veiculares na poluição local, principalmente nas grandes cidades controlando a concentração de gases de efeito estufa na atmosfera (LEITE, 2007; BALAT, et al., 2008).

Como combustível, o etanol tem várias vantagens sobre a gasolina tais como: o preço, o fato de proporcionar mais potência, força de arranque e velocidade. Contudo, o maior benefício é para o meio ambiente, já que comparado com a gasolina o uso do etanol reduz em cerca de 90% a emissão dos gases do efeito estufa, principais responsáveis pelo aquecimento global. Além dos carros flex-fuel (movidos a gasolina ou etanol), motocicletas flex-fuel já estão sendo comercializadas no mercado. Ônibus movidos por uma mistura de 95% de etanol e 5% de um aditivo já rodam no exterior e estão sendo testados no Brasil atualmente. O Ipanema, um pequeno avião agrícola fabricado no Brasil pela Embraer, voa com 100% de etanol. Entre as futuras utilizações do etanol está o desenvolvimento de bioplásticos (DIAS, 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, o maior exportador mundial, líder internacional da tecnologia de produção, a primeira economia do globo a atingir o uso sustentável dos biocombustíveis (DUARTE, LOURENÇO e RIVEIRO, 2006). Até Julho de 2010, contabilizou-se 434 plantas produtoras de etanol em território brasileiro. Para atender todas estas plantas foram necessários 70.000 fornecedores de cana-de-açúcar. Desta forma, estima-se que desde 1975 mais de 600 milhões de toneladas de CO₂ deixaram de ser emitidos para a atmosfera (UNICA, 2010).

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima para obtenção de etanol. Os substratos que compõe os mostos têm de ser adequados ao desenvolvimento do micro-organismo e à finalidade de sua atividade, que é gerar produtos de interesse. Além de uma composição capaz de suprir as exigências do micro-organismo, para seu melhor desempenho, deve estar devidamente

condicionado em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

O objetivo geral desse trabalho foi produzir etanol em fermentação submersa tendo como principal constituinte do meio o melaço de soja utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os experimentos foram realizados em três etapas: 1) fermentação do melaço “in natura”; 2) processo de hidrólise enzimática e posterior fermentação; 3) hidrólise e fermentação simultâneas, todos operados em bioreator batelada. Como objetivos específicos, podem ser citados: estudar a melhor concentração de substrato para cada experimento, estudar a hidrólise enzimática em diferentes temperaturas; determinar as distribuições do crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol nas fermentações; avaliar a hidrólise-fermentação do melaço de soja de forma seqüencial e simultânea.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Soja

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa de origem do leste asiático que possui uso variado na produção de proteína para rações, óleo vegetal e uma variedade de alimentos humanos como o queijo tofu, proteína texturizada e leite de soja.

Brasil e Estados Unidos se destacam como os dois maiores produtores de soja. Os Estados Unidos são responsáveis por 32% da safra mundial, 80,75 milhões de toneladas/ano. A produção do Brasil equivale a 28% da produção mundial, o que corresponde a 57,8 milhões de toneladas/ano (EMBRAPA, 2010).

Os três maiores continentes produtores de soja do mundo são América do Norte, América do Sul e Ásia. Segundo estimativa, a produção de soja nesses continentes cresceu expressivamente de 1961 até a data atual e poderá superar 500 milhões de toneladas na América do Sul, 100 milhões de t na América do Norte e 50 milhões de t na Ásia antes de 2020. Tais resultados mostram que a América do Sul se isolaria na liderança mundial, com destaque para a produção do Brasil e da Argentina. As Figuras 2.1 e 2.2 ilustram a evolução e estimativa da produção mundial de soja de 1961 a 2020 para o mundo e para a América do Sul, respectivamente (BNDES, 2004).

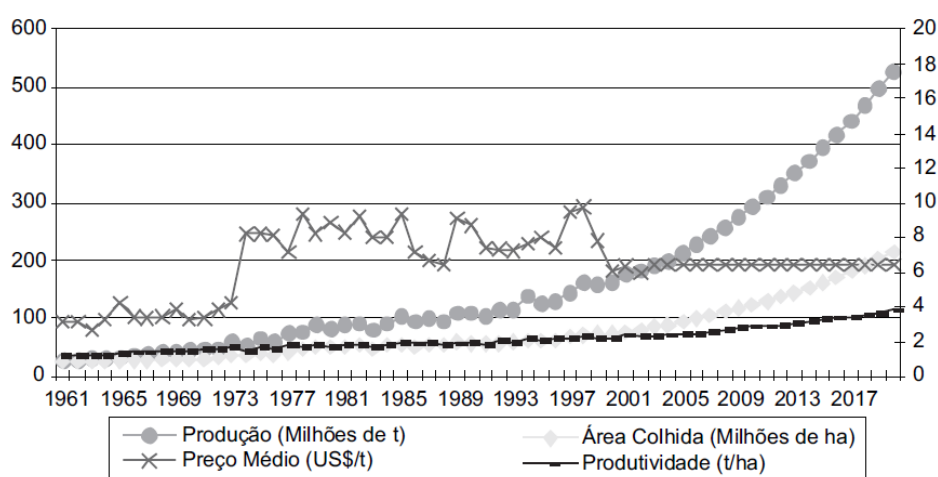


Figura 2.1: Evolução e estimativa da produção mundial de soja de 1961 a 2020. Fonte: BNDES, 2004.

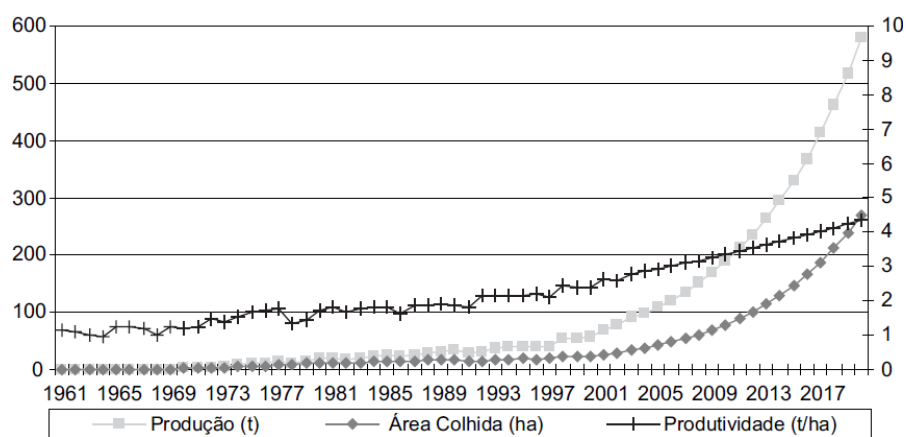


Figura 2.2: Evolução e estimativa da produção de soja na América do Sul de 1961 a 2020. Fonte: BNDES, 2004.

No Brasil, o significativo crescimento da produção de soja ocorreu nos anos 60 e na década seguinte a soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 1,5 milhões de toneladas (1970) para mais de 15 milhões de toneladas (1979) e para 32,89 milhões de toneladas em 2000. Esse crescimento foi gerado não apenas pelo aumento da área cultivada, mas, também, pelo expressivo incremento da produtividade, graças às novas tecnologias disponibilizadas aos produtores pela pesquisa brasileira (EMBRAPA, 2010).

A revolução socioeconômica e tecnológica protagonizada pela soja no Brasil Moderno pode ser comparada ao fenômeno ocorrido com a cana-de-açúcar, no Brasil Colônia e com o café, no Brasil Império/República, que, em épocas diferentes, comandou o comércio exterior do País. A safra 2008/2009 resultou em 57.165,5 milhões de toneladas de grãos de soja, a safra 2009/2010, 68.688,2 milhões de toneladas. O último levantamento de grãos da CONAB, em Junho de 2011 estima uma produção de 74,99 milhões de toneladas, o que significa um crescimento de 9,2% em relação à safra anterior (CONAB, 2011).

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Os principais produtos utilizados na alimentação humana derivados da soja são: o óleo de soja, margarina, gordura vegetal, a farinha desengordurada de soja, carne de soja, leite de soja, o tofu (queijo de soja), a lecitina de soja (utilizada na fabricação de chocolates e biscoitos) e o shoyu. O farelo de soja também é bastante utilizado para a alimentação animal,

principalmente como fonte de fibras e proteínas. Sua principal aplicação é na produção de rações para aves, suínos, gado, cabras e peixes (IMCOPA, 2011). Alimentos fermentados à base de soja como koji, miso, shoyu, são bastante consumidos no Japão e têm diversas funções biológicas, como atividades antioxidantes. (ROSA, 2009).

Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Nesse processo, também é produzida a lecitina, um agente emulsificante (substância que faz a ligação entre a fase aquosa e oleosa dos produtos), muito usada na fabricação de salsichas, maioneses, achocolatados, entre outros produtos (EMBRAPA, 2010). A Tabela 2.1 reúne os principais usos do óleo refinado e da lecitina de soja.

Tabela 2.1: Principais usos do óleo refinado de soja e da lecitina de soja. Fonte: EMBRAPA, 2010.

Produto	Uso Comestível	Uso Técnico
Óleo de soja	Manufatura	Ingredientes para calefação
	Antibióticos	Óleo Refugado
	Óleo de Cozinha	Desinfetantes
	Margarina	Isolação Elétrica
	Produtos Farmacêuticos	Inseticidas
	Temperos para Salada	Fundos de Linóleo
	Óleo para Salada	Tecidos e tintas para
	Pasta para Sanduíche	impressão
	Gordura Vegetal	Revestimentos
	Produtos medicinais	Plastificadores
		Massa para Vidraceiro
		Sabão
Leticina de soja	Produtos de Padaria	Fabricação de Escuma
	Produção de Balas	Fabricação de Álcool
	Revestimento de Chocolate	Fabricação de Tintas
	Produtos Farmacêuticos	Inseticidas
	Uso Médico	Cosméticos
	Uso Doméstico	Metais em Pó
	Fabricação de Margarina	Têxteis
	Gorduras	Emulsões

O grão de soja é uma típica semente leguminosa, como mostra a Figura 2.3. É composta pelo hilo (h), que tem forma linear elíptica. No final deste hilo há um pequeno encaixe chamado chalaza (c). A outra extremidade do hilo é chamada micrópilo (m), e acima deste está o hipocotile (hy). Esta leguminosa é rica em açúcares, proteínas e lipídeos. A Tabela 2.2 apresenta a composição química de cada componente do grão de soja.

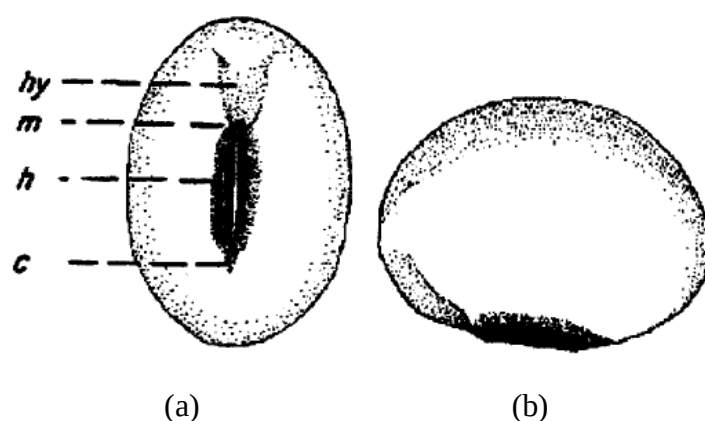


Figura 2.3: Semente de soja, visão da borda (a) h=hilo; c=chalaza; m=micrópilo; hy=hipocotile; (b) visão lateral do grão de soja. Fonte: ERICKSON, 1995.

Tabela 2.2: Composição química da soja e seus componentes (Base seca). Fonte: ERICKSON, 1995.

Componentes	Rendimento (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)
Grãos	100.0	40.3	21.0	4.9	33.9
Cotilédone	90.3	42.8	22.8	5.0	29.4
Casca	7.3	8.8	1.0	4.3	85.9
Hipocotile	2.4	40.8	11.4	4.4	43.4

Segundo Machado (1999), a soja apresenta uma composição protéica muito rica quando comparada a outros vegetais. Já a fração lipídica é composta principalmente por glicerídeos, fosfatídeos, e uma pequena parcela de matéria não saponificável. A soja também é rica em minerais como cálcio, fósforo, ferro e potássio. Também possui alto teor de fibras.

2.2 - Melaço de Soja

O melaço de soja é um co-produto gerado pela evaporação do líquido remanescente da secagem da proteína concentrada de soja (MACHADO, 1999) conforme esquematizado na Figura 2.4.

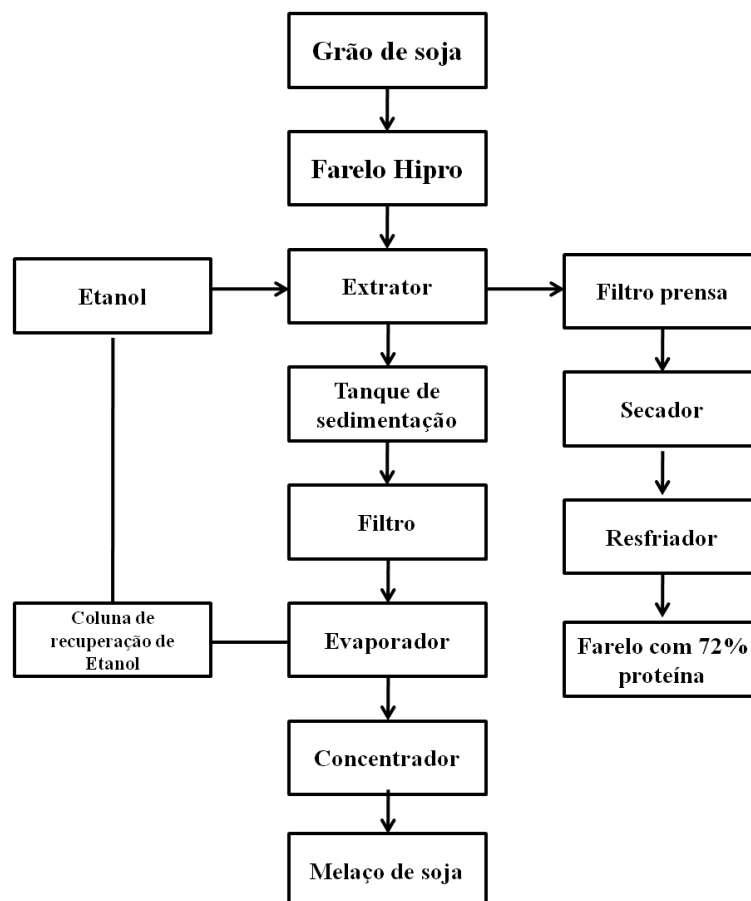


Figura 2.4: Fluxograma da produção de farelo concentrado de soja (72% de proteína).

Adaptado de Siqueira (2007).

No processo de obtenção do farelo concentrado de soja a partir do farelo hipro (48% de proteína), acontece uma extração com etanol. Da corrente alcoólica, que contém as proteínas, obtêm-se o farelo concentrado. A outra corrente líquida, rica em açúcares, passa por um processo de separação de sólidos e é levada a um evaporador para a recuperação de etanol, o líquido remanescente concentrado é chamado melaço de soja.

A Tabela 2.3 apresenta os açúcares encontrados em maior quantidade em amostras de melaço de soja e a porcentagem de cada um deles em base seca. Os três

mais abundantes são a sacarose, rafinose e estaquiose. Mussato e Mancilha (2007) generalizam a estrutura molecular dos oligossacarídeos presentes na soja como (Ga)_n-Gu-Fr, onde Ga: galactose, Gu: glicose e Fr: frutose.

Os oligossacarídeos consistem de duas, ou mais moléculas de monossacarídeos ligadas. Os principais oligossacarídeos incluem dissacarídeos (por exemplo, sacarose, maltose), trissacarídeos (por exemplo, rafinose), e tetrasacarídeos (por exemplo, estaquiose) (BOBBIO, 1992).

Tabela 2.3: Composição média do melão de soja (adaptado de SIQUEIRA, 2007).

Componente	% base seca
Carboidratos Totais	57,3
Glicose	0,243
Frutose	0,127
Galactose	0,254
Sacarose	28,4
Lactose	-
Rafinose	9,68
Estaquiose	18,6
Proteínas	9,44
Lipídeos	21,2
Fibras	5,7
Cinzas	6,36

A sacarose é considerada o oligossacarídeo mais importante nas plantas devido à sua alta concentração nas células, ampla distribuição e importância metabólica. Juntamente com o amido, a sacarose é um carboidrato de reserva principal. Em muitas plantas a sacarose representa mais de 95% do peso seco do material. A maltose também é comum, mas, geralmente, ocorre em concentrações inferiores a sacarose. Outros açúcares de sacarose e maltose e pequenas quantidades de oligossacarídeos da família da rafinose (rafinose, estaquiose e verbascose) são encontrados nos vasos condutores de seiva de certas plantas. Esses açúcares consistem da molécula de sacarose com número variável de unidades de galactose (Figura 2.5) (PALLARDY, 1997).

hidrólise diminui com o aumento de associações intermoleculares e as ligações glicosídicas são quebradas em meios ácidos, mais facilmente que em meios alcalinos.

A hidrólise de açúcares em meios ácidos segue o mecanismo ilustrado na Figura 2.6.

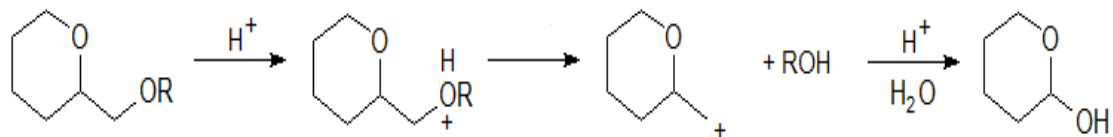


Figura 2.6: Representação do mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

Machado (1999) hidrolisou amostras de melaço de soja com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, reduzindo o pH até 3 e levando as amostras a autoclave a 121°C por 15 minutos. A concentração de açúcares redutores aumentou de 1,97 a 47,22 g/L. A fermentação do melaço hidrolisado não apresentou boa produtividade, provavelmente pela formação de sais durante o processo de acidificação e correção do pH para a fermentação.

Além da hidrólise ácida, os açúcares também podem ser hidrolisados via enzimas. A enzima α -galactosidade (EC 3.2.1.22) hidrolisa as ligações α -1,6 presentes nos oligossacarídeos como a rafinose e a estaquiose (Figura 2.7).

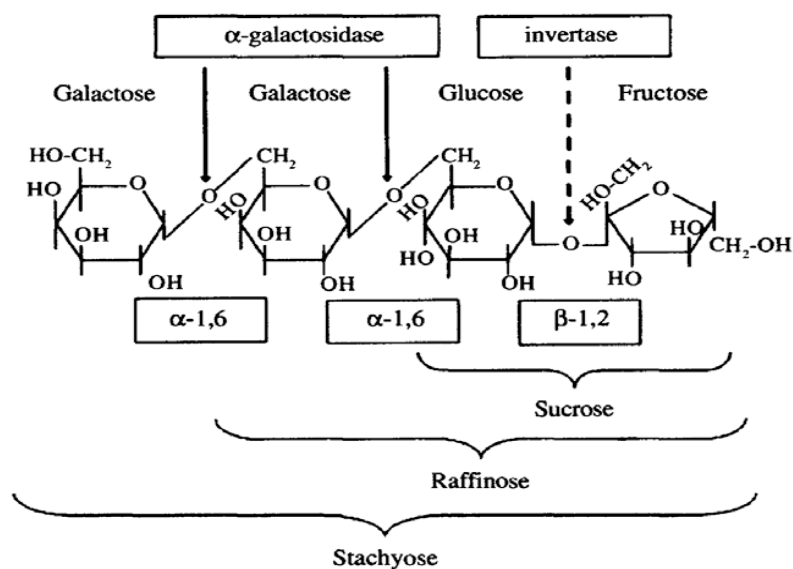


Figura 2.7: Estruturas de sacarose, rafinose e estaquiose com as ligações glicosídicas que unem suas estruturas e as enzimas que hidrolisam as ligações: invertase e α -galactosidase (SANADA, et.al, 2009).

Os primeiros estudos da hidrólise enzimática de carboidratos datam do século XIX. Em 1895, preparações enzimáticas a partir do sedimento de leveduras que hidrolisavam o dissacarídeo melibiose foram isoladas por Bau, Fischer e Lindner. O nome melibiose foi posteriormente mudado para α -galactosidase por Weidenhagen. Este cientista estudou a especificidade de ação da enzima usando açúcares com resíduos α -D-galactosil não-redutor terminal. A reação catalisada pela α -galactosidase está representada na Figura 2.8. (CALLEGARI, 2003).

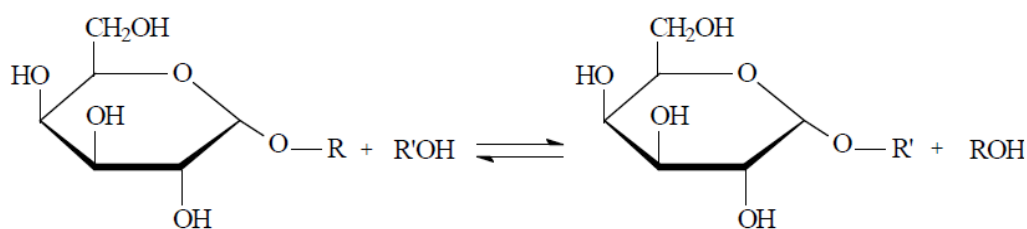


Figura 2.8: Esquema da reação catalisada pela α -galactosidase (CALLEGARI, 2003).

A molécula hidroxílica aceptora, R'OH , é comumente a água, embora R e R' possam ser grupos alifáticos ou aromáticos. Sob condições especiais, a síntese pode ocorrer usando a D-galactose como doador. Esse processo geralmente tem sido observado quando a enzima é incubada com altas concentrações de monossacarídeos,

resultando em moléculas derivadas da polimerização da glicose e galactose. (CALLEGARI, 2003). Estaquiose e rafinose são conhecidos como oligossacarídeos flatulentos (OF).

Várias indústrias têm interesse na hidrólise dos OFs. A indústria alimentícia deseja diminuir os teores destes oligossacarídeos com hidrólise para proporcionar aos consumidores melhores propriedades nutricionais e redução de problemas digestivos, o que contribui para ampliação do mercado consumidor de soja e derivados. A indústria de ração animal também usa a enzima α -galactosidase em dietas animais para aumentar a digestibilidade e reduzir a fermentação de açúcares não digeríveis. A indústria de papel utiliza da hidrólise enzimática para facilitar a remoção da lignina no branqueamento da polpa (SANADA, 2009).

2.4 - α -galactosidase

As enzimas quando comparadas com catalisadores químicos tem a característica da especificidade pelo substrato e a capacidade de promover somente uma reação bioquímica com seu substrato, em condições brandas de reação e menores problemas ambientais e toxicológicos. Elas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam. As seis classes representativas das enzimas industriais são: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e específicas, o que minimiza a geração de co-produtos indesejáveis (SANTOS, 2007).

As enzimas galactosidases pertencem à classe das hidrolases, são glicosidases que catalisam a hidrólise de ligações α -(1,6)-galactosídicas, liberando a α -D-galactose. As α -galactosidases e β -galactosidases constituem um grupo de exoglicosidases que catalisam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-galactose em ligação α e β , respectivamente (GÓES e RIBEIRO, 2002).

A hidrólise de oligossacarídeos gera açúcares redutores além de sacarose, que é um dissacarídeo fermentescível. A degradação dos oligossacarídeos requer a ação de α -galactosidases e de invertases (CALLEGARI, 2003). As α -galactosidases são encontradas em plantas e animais e catalisam a hidrólise de ligações α -1,6 de uma variedade grande de substratos atuando no reconhecimento celular, no transporte de

açúcares e como glicoproteína na organização de sistemas multi-enzimáticos. Além disso, podem agir como antibiótico contra as bactérias do solo, protegendo a planta contra substâncias α -galactosídicas fitotóxicas produzidas por micro-organismos invasores (PORTER et al., 1992 *apud* ADEMARK et al, 2001).

A α -galactosidase pode ser obtida a partir de bactérias, fungos ou vegetais. Procurando otimizar a produção e obtenção desta enzima, estas diferentes fontes têm sido estudadas por vários autores. Apesar da enzima de origem bacteriana ter produção maior que a enzima de origem fúngica, as α -galactosidases de fungos são obtidas mais facilmente devido à sua localização extracelular e seu amplo perfil de estabilidade (GÓES e RIBEIRO, 2002).

Le Blanc et al (2004) estudaram a utilização de bactérias lácticas geneticamente modificadas para produção da enzima α -galactosidase e obtiveram eficiência da degradação de moléculas de rafinose e estaquiase.

Yamaguishi (2008) estudou um processo de produção de feijão em pó, visando disponibilizar um produto sem os oligossacarídeos da família rafinose. O micro-organismo usado para produção de enzimas α -galactosidases foi a bactéria *Lactobacillus agilis* LPB 56. Os melhores resultados para o consumo da estaquiase, que chegou a 100%, foram a fermentação a 37°C, utilizando 10% de inóculo e 1% de CaCO₃.

Enzimas α -galactosidases obtidas de fungo *Penicillium griseoroseum* se mostraram eficientes na redução dos OFs presentes em produtos derivados da soja (FALKOSKI, 2007). Os fungos *Aspergillus niger* também foram capazes de produzir enzimas α -galactosidases com propriedades hidrolíticas (MANZANARES, GRAFF e VISSER, 1998; SCIGELOVA e CROUT, 2000; ADEMARK et al, 2001).

A obtenção de α -galactosidases de plantas também é de grande interesse, visando aplicação em processos industriais. Já foram purificadas, a partir de plantas, α -galactosidases de *Platymiscium pubescens* (LIMA et al, 2004), *Helianthus annuus* (KIM, 2003), *Ganoderma lucidum* (SRIPUAN, AOKI, 2003), *Rehmannia glutinosa* (ZHAO et al, 2006), de sementes de *Schizolobium parahyba* (SILVA, 2007), sementes de *Tachigali multijuga* (FIALHO, 2007), entre outras.

Shabalin e colaboradores (2001) estudaram propriedades enzimáticas de α -galactosidase de *Trichoderma reesei* na hidrólise de oligossacarídeos. Os autores propuseram um modelo para simular a cinética de hidrólise da estaquiase e da rafinose.

Thippeswamy e Mulimani (2001) imobilizaram em gel de poliacrilamida enzimas α -galactosidases de *Gibberella fujikuroi*. A enzima livre mostrou mais de 90% de atividade e a enzima imobilizada 100% de atividade por mais de 6h. Após 3 h de incubação, oligossacarídeos da família rafinose foram reduzidas para 79 e 66% por α -galactosidase livre e imobilizada, respectivamente.

Em estudo realizado por Viana et al (2006), a enzima α -galactosidase imobilizada, derivada de *Debaryomyces hansenii* UFV-1, apresentou uma atividade de 40 U por g de sílica e atividade de 50%. O pH ótimo para enzima livre e imobilizada foi 5,0 e temperatura ótima de 60 e 80° C, respectivamente. O tratamento de melaço de soja com a enzima livre por 6 horas promoveu redução da concentração de estaquiase e rafinose em 100% e 50%, respectivamente.

As reações enzimáticas de forma geral sofrem efeito do pH e da temperatura. Os efeitos do pH devem-se à ionização do substrato e resíduos de aminoácidos das enzimas e são manifestados como mudanças na atividade catalítica das enzimas, estabilidade, interações com ligantes, ou mudança no equilíbrio da reação. O pH, ou faixa de pH de maior estabilidade da enzima depende de muitos fatores, tais como: a temperatura, força iônica, concentração de substrato, concentração de enzimas. Um aumento na temperatura implica maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. As reações enzimáticas se comportam, até certo ponto, de forma semelhante às outras reações, contribuindo conseqüentemente para a formação do complexo enzimático. Mas com o aumento contínuo da temperatura, poderá haver uma inativação gradativa da enzima, até inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor. Assim, existe uma temperatura máxima de trabalho.

2.5 – Fermentação Alcoólica

2.5.1 – Matéria-prima

A produção biológica do etanol pode utilizar diferentes biomassas que contenham quantidades significativas de açúcares fermentescíveis, conforme Figura 2.9. Há um leve predomínio da produção com base em materiais amiláceos (53% do total), como milho, trigo e outros cereais e grãos (BNDES, 2008; BRINGHENTI, et al., 2006).

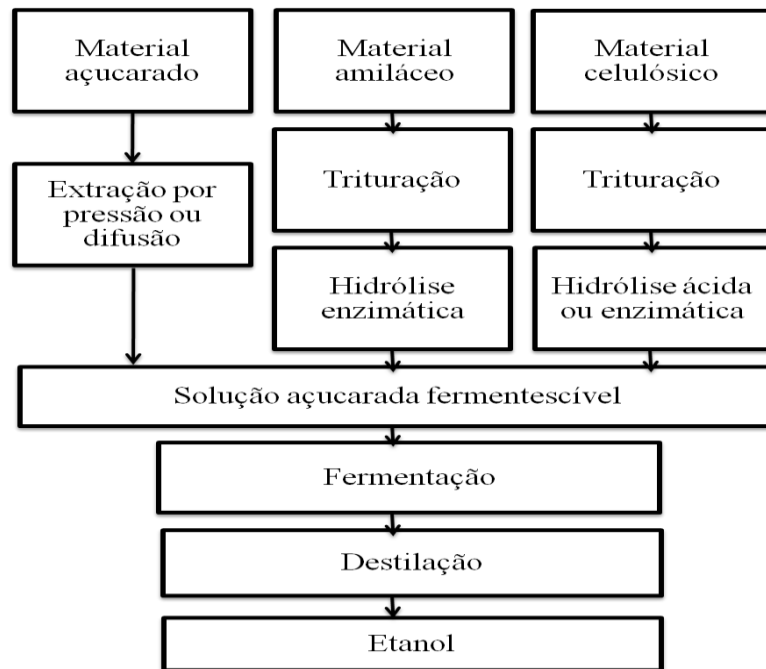


Figura 2.9: Rotas tecnológicas para produção de etanol a partir de diferentes biomassas (BNDES, 2008).

O milho é a matéria-prima utilizada pelo maior produtor de etanol do mundo, os Estados Unidos da América. Em 2008 foram produzidos 9000 milhões de galões de etanol por este país, 38% a mais que a produção do ano anterior (RFA, 2010). O processo americano consiste na hidrólise enzimática do amido e em seguida, a fermentação do hidrolisado. A produção do etanol de milho pode ser feita via seca ou via úmida, sendo o processo de via seca o mais utilizado no país.

Outro amiláceo produtor de etanol é a mandioca. Ostrowski et. al (2006) apresentaram um trabalho onde produziram etanol do polvilho de mandioca, com hidrólise enzimática e fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores obtiveram 38% de rendimento. A fermentação de amido residuário da fabricação da farinha de mandioca enriquecido com teores de melaço de cana também foi estudada por Bringhenti et al. (2006). Os autores concluíram que a adição de melaço ao resíduo de mandioca em doses a partir de 10% levou a um aumento no teor de açúcares no mosto, promovendo uma maior produção de etanol cerca de 112% em relação à solução sem o aditivo.

Resíduos de conservas de abacaxi também foram fermentados utilizando células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação contínua. A produtividade máxima foi de 42,8 g de etanol/L.h a uma taxa de diluição de 1,5 h⁻¹ (NIGAM, 2000).

O soro de queijo também é reconhecido como uma fonte de açúcar, potencial para a produção de etanol. Além disso, a utilização deste resíduo é uma forma de diminuir o fluxo de resíduos com alta carga poluidora. Como há um grande excedente de lactose no soro de queijo, a sua conversão em produtos a granel, tais como bioetanol precisa ser considerada como uma possível solução, o que de fato tem sido feito por muitos anos por fábricas de laticínios em Portugal e Nova Zelândia. Apesar de alguns exemplos de aplicação industrial, a tecnologia de fermentação deve ser melhorada (GUIMARÃES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010). Souza (2005) estudou a fermentação simultânea à hidrólise do soro de queijo utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo o autor, chegou-se a uma produtividade de 3,66 g/L.h e 93,9% de rendimento ($Y_{P/S}$) utilizando 90g/L de soro de queijo, 3,0g/L de nutrientes, 50 g/L de inóculo, 0,2 g/L de enzima β -galactosidase, obtida do cultivo de *Aspergillus oryzae*, e 300 rpm de agitação.

Resíduos agrícolas como palha de milho e palha de trigo são importantes matérias-primas (insumos) para o desenvolvimento da indústria de etanol de biomassa celulósica, pois são fontes de carboidratos complexos e de baixo custo. Para obter níveis elevados de bioconversão de etanol a partir da biomassa dessas fontes, faz-se necessário o uso de um processo termoquímico, chamado pré-tratamento, antes da hidrólise enzimática de carboidratos complexos em açúcares simples, que pode ser fermentada para etanol. A casca de soja também foi avaliada como um recurso para produção de etanol pela sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Os resultados obtidos para os testes resultaram em uma produção de etanol de 3-4 vezes maior que a palha de milho ou a palha de trigo (MIELENZ, BARDSLEY e WYMAN, 2010).

Além das cascas da soja, outro resíduo desta leguminosa é matéria-prima para a produção de etanol: o melaço de soja (MACHADO, 1999; SIQUEIRA, *et al.*, 2008). A produção de etanol por melaço de soja representa uma alternativa que se destaca por ampliar a quantidade de etanol gerado e aumentar o valor agregado desse subproduto que atualmente é utilizado como ração animal.

Machado (1999) obteve rendimento de 55,60%, comparado ao 51,1% em relação a glicose, com fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* (nome comercial Fermol) em pH 6,0 e temperatura de 30°C. Além disso, o autor estudou a aditivação do substrato

com MgSO_4 a 0,1 g/L e hidrólise ácida, concluindo que apesar da hidrólise disponibilizar grande quantidade de açúcares, maior conversão foi observada para o melaço de soja aditivado com sulfato de magnésio. O autor sugere que o comportamento pode ter ocorrido devido a formação de sais gerados durante o processo de acidificação e posterior correção do pH do melaço de soja.

Letti (2007) utilizou cepas de *Zymomonas mobilis* para fermentar melaço de soja. As cepas foram capazes de crescer e produzir etanol a partir de melaço de soja diluído, sem adição de quaisquer sais e qualquer carbono extra ou fontes de nitrogênio. Os testes de cinética de fermentação revelaram que a *Zymomonas mobilis* foi capaz de degradar a estaquiose e a sacarose, mas não rafinose, melibiose e galactose. O autor realizou experimentos de hidrólise ácida e enzimática para o melaço de soja e concluiu que a hidrólise ácida colaborou para o aumento da produção de etanol em 2,0%; 2,4% e 2,8% para os ácidos clorídrico, fosfórico e sulfúrico, respectivamente. Os ensaios com a enzima forneceram resultados muito superiores, sendo capaz de aumentar a quantidade de açúcares simples, sem comprometê-los. A produção de etanol foi aumentada para 33,2% em relação ao controle.

Siqueira (2007) estudou a hidrólise ácida e enzimática do melaço de soja. Testes com hidrólise ácida aumentaram em até 21 vezes a concentração de açúcares redutores, e a hidrólise enzimática aumentou em quase 6 vezes a mesma concentração. A hidrólise do melaço de soja, em condições otimizadas (120 ° C, 20 min, pH 3,5 ajustado com H_2SO_4), foi eficiente na quebra de ligações de sacarose e também sobre a remoção de uma unidade de monossacarídeo de estaquiose e rafinose. No entanto, essas ligações são clivadas pela enzima invertase, que é produzida pela levedura. Portanto, a hidrólise em tais condições não melhora o rendimento da fermentação de etanol, apesar do aumento da concentração de açúcares redutores. A hidrólise enzimática (500g de enzima por tonelada de melaço de soja, pH 5,0, 55 ° C, 24h), utilizando enzima AEO alfa-galactosidase 301 (Prozyn), disponibilizou os açúcares redutores, que não foram capazes de ser fermentados antes. A hidrólise enzimática de melaço de soja converteu 75% dos açúcares não redutores em açúcares fermentescíveis, com um aumento de 20% na produção de etanol a partir da fermentação.

2.5.2 – Micro-organismos

Destacam-se como produtoras de etanol, espécies do gênero *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* e outras. Entre muitos micro-organismos produtores de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* ainda permanece como a espécie principal. *Zymomonas mobilis* também tem sido intensamente estudada (KANNAN, SANGILYANDI E GUNASEKARAN, 1998; DAVIS et al, 2006; CAZETTA et al, 2007).

Palha de trigo hidrolisada com ácido foi fermentada a etanol por *Pichia stipitis* com eficiência de conversão de até 84% (NIGAM, 2000b). Cho et al (2001) utilizaram resíduos de madeira provenientes de demolição e construção para produção de etanol. As amostras foram tratadas com ácido sulfúrico fornecendo glicose, xilose e manose, que foram fermentados a etanol por *Pichia stipitis*, com até 90% de eficiência. A cepa de levedura termotolerante *Pichia kudriavzevii* foi adaptada a galactose produzindo em média 30% a mais de etanol do que as leveduras não adaptadas, a partir de caldo de cana de açúcar (DHALIWAL et al, 2011).

Z. mobilis é uma bactéria anaeróbica gram-negativa, não esporulante e móvel, anaeróbia facultativa, sendo que, algumas linhagens são obrigatoriamente anaeróbias. Esta fermenta glicose e frutose gerando quantidades praticamente equimolares de etanol e CO₂, formando colônias de coloração branca ou creme. A fermentação de 1 mol de glicose dá origem a 1,6 de etanol, 1,8 moles de CO₂ e pequena quantidade de outros subprodutos com lactato, acetaldeído, ácido acético, glicerol, acetoína, dihidroxicetona, sorbitol, manitol, levana e ácido glicônico. As condições ideais para o crescimento desta bactéria são intervalos de temperatura de 30 a 36°C e intervalos de pH entre 5 e 7. Cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol, CO₂, lactato e outros, seguindo um balanço metabólico simples (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2009). A Figura 2.10 representa o metabolismo da bactéria *Z. mobilis*.

A espécie mais importante de levedura alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, que possui capacidade de converter açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico e um largo espectro de utilização, sendo empregada na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol, entre outros produtos. Quanto à levedura utilizada, devem ser avaliados o rendimento e a produtividade, ou seja, a rápida conversão de açúcar em

Diagrama de Fluxo Metabólico da Via dos Açúcares em Leveduras

Membranas: Membrana externa (ponto de entrada dos açúcares), Membrana citoplasmática (barreira para o citoplasma).

Entrada de Açúcares: Sacarose e Levana entram na célula através da membrana externa.

Conversão e Transporte:

- Sacarose e Levana são convertidos em Frutose e Glicose por **INV B** e **LEV U**.
- Frutose e Glicose são transportados para o citoplasma por um **Transportador frutose e glicose**.
- Sorbitol e Gliconato são transportados para o citoplasma por **Transportador sorbitol** e **Transportador gliconato**, respectivamente.

Metabolismo no Citoplasma:

- Glicose** é convertida em **Glicose-6-P** por **GLK**.
- Frutose** é convertida em **Frutose-6-P** por **FRK**.
- Frutose-6-P** é convertido em **Glicose-6-P** por **PGI**.
- Glicose-6-P** é convertida em **6-P-Gliconolactona** por **ZWF**.
- 6-P-Gliconolactona** é convertida em **6-P-Gliconato** por **PGL** e **EDO**.
- 6-P-Gliconato** é convertido em **2-ceto-3-deoxi-6-fosfogliconato (KDPG)** por **EDA**.
- KDPG** é convertido em **Piruvato** por **PDC**.
- Piruvato** é convertido em **Acetaldeído + CO₂** por **PDC**.
- Acetaldeído** é convertido em **Etanol** por **ADH**.
- Piruvato** também pode ser convertido em **Acetil-CoA + CO₂** por **PDHC**, que entra no ciclo de Krebs.
- Frutose-6-P** é convertido em **Xilulose-5-P** por **TKT**.
- Xilulose-5-P** é convertido em **Eritrose-4-P** por **TKT**.
- Eritrose-4-P** é convertido em **Gliceraldeído-3-P** por **GAP**.
- Gliceraldeído-3-P** é convertido em **1,3-Di-P-Glicerato** por **PGK**.
- 1,3-Di-P-Glicerato** é convertido em **3-P-Glicerato** por **PGM**.
- 3-P-Glicerato** é convertido em **2-P-Glicerato** por **ENO**.
- 2-P-Glicerato** é convertido em **Fosfoenolpiruvato** por **PYK**.
- Fosfoenolpiruvato** é convertido em **Piruvato** por **PYK**.
- Piruvato** também pode ser convertido em **Acetaldeído + CO₂** por **PDC**.
- Piruvato** também pode ser convertido em **Acetil-CoA + CO₂** por **PDHC**, que entra no ciclo de Krebs.
- Acetil-CoA + CO₂** é convertido em **Oxaloacetato** por **PPC**.
- Oxaloacetato** é convertido em **Malato** por **ME**.
- Malato** é convertido em **Fumarato** por **ME**.
- Fumarato** é convertido em **Succinato** por **ME**.
- Succinato** é convertido em **Succinil-CoA** por **ME**.
- Succinil-CoA** é convertido em **2-Oxoglutarato** por **ME**.
- 2-Oxoglutarato** é convertido em **Isocitrato** por **ME**.
- Isocitrato** é convertido em **Citrato** por **ME**.
- Citrato** é convertido em **Oxaloacetato** por **ME**, completando o ciclo de Krebs.

Legenda:

- INV B:** invertase
- LEV U:** levanasacarase
- GFOR:** glicose-frutose oxidoreductase
- GNL:** gliconolactonase
- FRK:** frutoquinase
- GLK:** glicocinase
- PGI:** fosfoglicose isomerase
- ZWF:** glicose-6-fosfato desidrogenase
- GNTK:** gliconatoquinase
- TKT:** transketolase
- PGL:** 6-fosfogliconolactonase
- EDO:** 6-fosfogliconato desidrogenase
- GAP:** gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- EDA:** 2-ceto 3-dioxi 6-fosfogliconato aldolase
- PGK:** fosfoglicerato quinase
- PGM:** fosfoglicerato mutase
- ENO:** enolase
- PYK:** piruvato quinase
- PPC:** fosfoenolpiruvato carboxilase
- PDHC:** piruvato desidrogenase
- ADH:** piruvato descarboxilase álcool desidrogenase
- PDC:** fosfatase

2.5.3 - Bioquímica da fermentação alcoólica

19

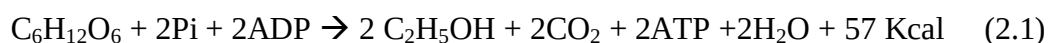
enzimáticas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Segundo Amorim (1996), a levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária a sua sobrevivência (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros) e biossínteses, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. Desta forma, o etanol e o gás carbônico resultantes da fermentação são apenas e tão somente um subproduto desse processo, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. Entretanto, o etanol, bem como outros produtos de excreção podem ser oxidados metabolicamente, gerando mais ATP e biomassa em condições de aerobiose.

A transformação do açúcar em etanol e gás carbônico envolve 12 reações em sequência ordenada conhecida como via glicolítica ou via EMP, onde cada reação é catalisada por uma enzima específica. As rotas produtoras de energia ou catabólicas geram ATP e coenzimas necessárias para as diversas reações biossintéticas, e intermediários químicos utilizados como pontos de partida para as diversas reações de biossíntese. Um produto final significativo de todas as rotas é o ácido pirúvico, que em anaerobiose é precursor dos ácidos, alcoóis e outros produtos (Figura 2.11) (LIMA, BASSO E AMORIM, 2011).

A principal rota metabólica envolvida no processo de produção de etanol é a glicólise, onde uma molécula de glicose é metabolizada gerando duas moléculas de piruvato. Sob condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a etanol com liberação de CO₂. As duas moléculas de ATP produzidas na glicólise são utilizadas na síntese de novas células de fermento. Sem o consumo de ATP na reprodução celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido por causa do acúmulo de ATP que inibiria a enzima fosfofrutoquinase (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

De forma global, pode-se representar a fermentação alcoólica pela equação de Gay-Lussac, na qual se observa que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (CO₂) (88 g) e 57 kcal de energia (Equação 2.1) (LEHNINGER, 1995).



Fermentação alcoólica

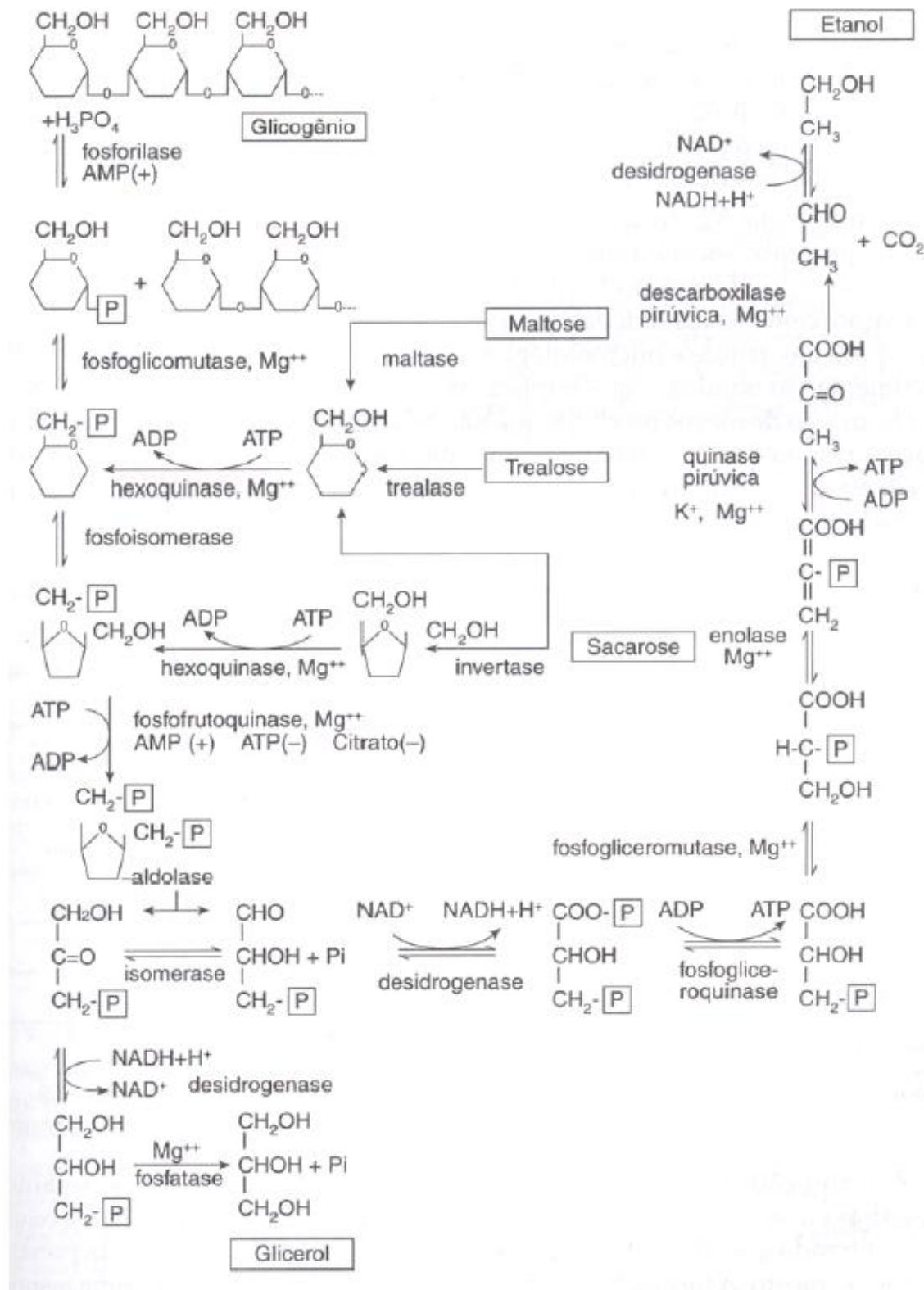


Figura 2.11: Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae* (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

2.5.4 - Fatores que influenciam na fermentação alcoólica

Durante o processo de fermentação as leveduras podem sofrer de vários estresses. Algumas são ambientais, tais como deficiência de nutrientes, alta temperatura e contaminação, enquanto outras são provenientes do metabolismo das células de levedura, como o acúmulo de etanol e sua inibição sobre o crescimento. A Figura 2.12 resume algumas dessas tensões. Muitas delas são sinérgicas levando à redução da viabilidade da levedura, bem como menor rendimento do etanol (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

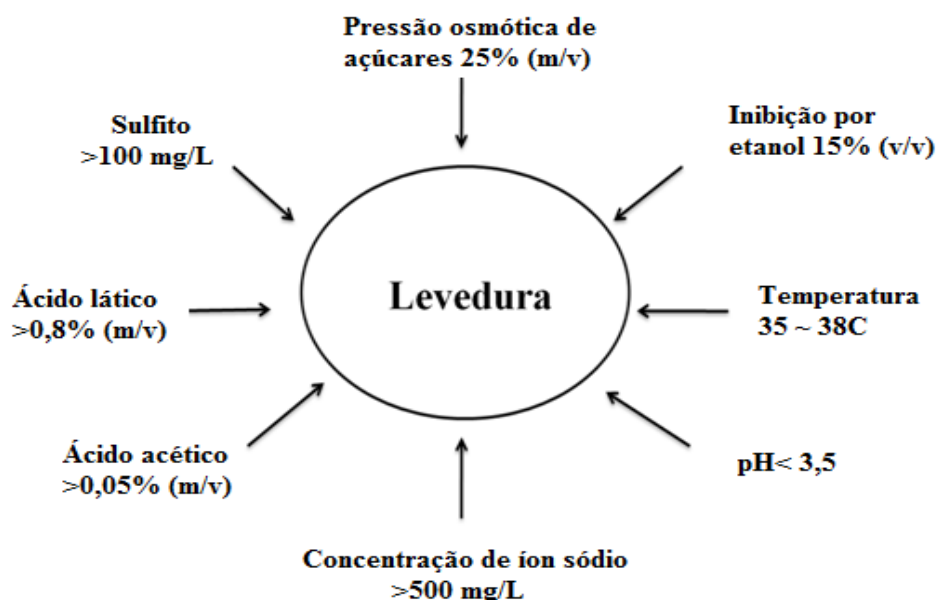


Figura 2.12: Potencial de estresse de *S. cerevisiae* durante fermentação alcoólica.

Adaptado de INGLEDEW, 1999 *apud* BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008.

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem, concentração da levedura, contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação alcoólica (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

As melhores temperaturas para produção de etanol situam-se entre 26 e 35°C, mas as destilarias alcançam até 38°C (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). Torija et al (2003) estudaram o efeito da temperatura em populações de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação, concluindo que, em temperaturas entre 25 e 31°C a taxa

inicial de fermentação é maior, mas acima de 35°C a viabilidade celular decresce. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol. Segundo Amorim (2005) a temperatura pode chegar aos 35°C se a contaminação for controlada e mantida entre 5.10^6 a 1.10^7 bactérias/mL. Nesta temperatura a levedura multiplica menos e aumenta o rendimento.

O pH correto para favorecer a levedura e inibir o desenvolvimento de muitos tipos de bactérias está entre 4,0 e 5,0. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5 (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). O pH baixo do meio demonstra ser o fator de maior estresse fisiológico para *Saccharomyces cerevisiae* obtida e utilizada em destilarias de produção de etanol carburante, quando comparado com outros fatores (sulfito, ácido lático e teor alcoólico elevado). O pH 4,5 no mosto permite uma proteção contra os fatores de estresse, obtendo-se maior viabilidade celular, brotamento, rendimento alcoólico, morfologia regular das leveduras, diminuição no açúcar residual e menor liberação de aminoácidos no meio, propiciando melhor eficiência alcoólica e estabilidade do processo (DORTA, 2006). Segundo Machado (1999), o valor de pH ótimo para cada fermentação depende do tipo de levedura empregada, mas devendo ser igual ao valor ótimo de crescimento da levedura, já que a produção de etanol é ligada ao crescimento celular.

Reis e Ribeiro (2009) realizaram um estudo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 a partir de um planejamento experimental que possibilitou a obtenção das condições ótimas para a manutenção celular e a produção de etanol. As faixas das variáveis que maximizaram a viabilidade celular foram: temperatura de 21,5 a 31°C, pH de 3,2 a 4,3, e concentração de sulfito de 0 a 45 mg/L. Para a quantidade final de trealose, o intervalo da temperatura que maximizou a resposta foi de 23,5 a 38°C, o pH, de 3,5 a 4,6 e a concentração de sulfito, de 0 até 90 mg/L. Para atingir a maior produção de etanol, a faixa de temperatura mais adequada foi de 32,5 a 38,5°C, a faixa de pH foi de 3,5 a 4,3 e a de concentração de sulfito foi de 0 a 45 mg/L. Concluiu-se, com base nas análises em relação à viabilidade e à quantidade final de trealose, que valores mais elevados de temperatura, mais baixos de pH e mais alta concentração de sulfito, na região experimental adotada, são condições estressantes à levedura que faz uso de seu carboidrato endógeno de proteção para se manter.

Entre os vários estresses que as células de levedura sofrem durante a fermentação alcoólica, a inibição por etanol e pressão osmótica são as mais importantes,

especialmente sob condições de alta pressão, em que as células de levedura crescem no meio contendo açúcares em concentrações acima de 250 g/L para atingir mais de 15% (v/v) de etanol. A concentração de açúcares para fermentação alcoólica deve ser mantida na faixa de 10 a 20%. Valores menores que 10% não inviáveis e valores entre 20 e 30% tem a cinética de formação de etanol desfavorável, pois são inibitórias devido a alta pressão osmótica que encerram. Concentrações acima de 30% causam plasmólise das células (MACHADO, 1999).

O etanol não só inibe o crescimento de células, mas também reprime o transporte de glicose, o que leva à deficiência no metabolismo da levedura. A maior tolerância ao etanol pelas leveduras está ligada à presença de ácidos graxos insaturados e grupos acil presentes na membrana da célula, assim, leveduras com baixa tolerância a etanol tem baixos índices de lipídeos em sua membrana e baixa permeabilidade ao etanol, o que acaba causando acúmulo dentro da célula. Portanto, é fundamental para escolha de células de levedura assegurar a viabilidade celular e de bom rendimento da fermentação alcoólica para a reciclagem de células (ZHAO e BAI, 2009).

Alguns nutrientes devem estar presentes na fermentação a fim de suprir necessidades das leveduras (Tabela 2.4). A quantidade necessária para cada composto varia, mas a presença de níveis maiores que o recomendado pode causar inibição no processo fermentativo.

Tabela 2.4: Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica (AMORIM, 2005).

Mineral	Variação no Mosto (mg/L)	Recomendação (mg/L)
N-assimilável (NH_4^+ R - NH_2)	7 – 350	100 – 300
Fósforo (P)	20 – 200	50 – 250
Potássio (K)	300 – 1200	700 – 1300
Magnésio (Mg)	80 – 3900	100 – 200
Enxofre (S)	80 – 3900	Menor que 80
Cálcio (Ca)	150 – 2000	Menor que 150
Zinco (Zn)	0,45 – 9	1 – 5
Cobre (Cu)	0,20 – 8	1 – 5
Manganês (Mn)	2 – 8	1 – 5
Alumínio (Al)	5 – 240	<300 (mosto de caldo)

Segundo Amorim (2005), as concentrações de nutrientes apresentados na Tabela 2.4 já podem estar presentes no mosto, sendo desnecessárias adições.

2.5.5 - Fermentação e hidrólise simultâneas

Uma das principais vantagens do processo de hidrólise e fermentação separada é que cada etapa pode ser executada em suas condições ótimas. Os fatores mais importantes a serem levados em conta para a etapa de sacarificação são: tempo, temperatura, dosagem de enzimas, o pH e a carga de substrato. O processo de hidrólise e fermentação simultânea (HFS) apresenta índices mais atraentes do que a hidrólise e fermentação sequenciais (HFSE) como maior produtividade de etanol e menor consumo energético. O processo HFS opera em condições não ideais para a hidrólise e exige maior dosagem de enzimas, que influencia positivamente na conversão de substrato, mas negativamente sobre os custos do processo (SANCHEZ e CARDONA, 2007).

O processo de hidrólise e fermentação simultânea é muito utilizado para produção de etanol por materiais lignocelulósicos, pois a conversão de lignocelulose a álcool resultaria em um processo mais rentável (KÁDAR, SZENGYEL e RÉCZEY, 2003).

A hidrólise e fermentação de bagaço de cana foi estudada de forma sequencial e simultânea por Santos et al (2010). Os autores observaram que em ambos os processos a conversão enzimática aproximou-se de 16 h, porém HFS exigiram menores quantidades de enzimas. Além disso, o processo sequencial de hidrólise e fermentação gastou tempo maior, totalizando 72 h, enquanto a HFS totalizou 40 h de processo.

Outro estudo foi realizado buscando produzir etanol a partir de resíduos lignocelulósicos (folhas de cana e *Antigonum leptopus* folhas) utilizando celulasas de *Trichoderma reesei* e células de levedura termotolerante *Kluyveromyces fragilis* NCIM 3358 e *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-132. *K. fragilis* resultou em melhor desempenho no processo de HFS e altos rendimentos de etanol ($2,5 \pm 3,5\%$ m/v) em comparação com *S. cerevisiae* ($2,0 \pm 2,5\%$ m / v). Observou-se aumento da produção de etanol quando a celulase foi suplementada com β -glicosidase. As conversões de *K. fragilis* foram concluídas em um curto espaço de tempo (KRISHNA, REDDY e CHOWDARY, 2000).

Ôhgren et al (2006) estudaram a HFS dos dois principais açúcares dos resíduos agrícolas de milho, a glicose e xilose com *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. A produtividade de etanol aumentou com o aumento da concentração de hidrolisado de pré-tratamento quando a HFS foi realizada em batelada alimentada.

Hidrólise e fermentação simultâneas de alta gravidade de batata triturada, contendo 304 g/L de carboidratos dissolvidos, foi realizado para a produção de etanol. O amido da mistura foi levado a maltodextrinas pela ação de α -amilase termo-estável a 85°C. Em seguida, foi realizada a 30°C a adição simultânea de glicoamilase, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. A concentração ideal de glicoamilase, de sulfato de amônio e o tempo de fermentação foram obtidos através da metodologia de superfície de resposta. Usando a condição otimizada, o rendimento de etanol obtido foi 16,61% (v/v), que era equivalente a 89,7% do rendimento teórico (SRICHUWONG et al, 2009).

Condições ótimas para três tipos de bioprocessos com amido foram discutidas: a sacarificação simples de amido em glicose, a fermentação simples de glicose a ácido láctico e sacarificação e fermentação simultâneas de amido. Um aumento de 20% na produtividade de lactato foi obtido através do processo de hidrólise e fermentação simultâneas em batelada alimentada (ROY, 2001).

Vários outros autores estudaram os processos de hidrólise e fermentação simultâneas (KARIMI, EMTIAZI e TAHERZADEH, 2006; SASSNER, GALBE e ZACCHI, 2006; SAHA e COTTA, 2007; OLOFSSON, RUDOLF e LIDÉN, 2008; NIKOLIC et al, 2009; SHINOZAKI e KITAMOTO, 2011)

2.6 - Planejamento experimental

O planejamento de experimentos é uma ferramenta que permite a otimização de um processo, desenvolvimento de formulações dentro de parâmetros estabelecidos e avaliação de efeitos e impactos que os fatores possuem em relação à resposta desejada. Várias vantagens do uso do planejamento experimental podem ser citadas: redução do tempo de experimentação, redução dos custos de execução dos ensaios, avaliação conjunta da influência de variáveis estudadas, possibilidade de otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O planejamento composto central (PCC) é utilizado quando se quer verificar a curvatura de um plano, ou seja, a existência de termos quadráticos no modelo de regressão. O PCC consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial 2^k , com n_F corridas, $2k$ corridas axiais ou estrela e n_C corridas centrais. Dois parâmetros devem ser especificados: a distância α a partir do centro do planejamento até os pontos axiais e o número de pontos centrais n_C (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

No planejamento experimental do tipo planejamento composto central cada variável é estudada em 5 níveis diferentes ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$), cada nível possuindo seu valor nominal. O parâmetro α utilizado neste trabalho foi ortogonal, afim de obter um PCC onde a matriz de variância e covariância é diagonal e onde os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX et al., 1978).

Usam-se superfícies de resposta quando as variáveis de resposta não são influenciadas por muitas variáveis independentes e o objetivo é otimizar respostas. Se uma resposta é função de dois fatores, x_1 e x_2 , onde ε é o erro observado ou ruído na resposta y , a superfície que representa a Equação 2.1 é chamada de superfície de resposta (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (2.1)$$

Autores como Box et al (1978) acreditam que a metodologia do planejamento de experimentos aliada à uma análise de superfícies de resposta permite estatisticamente verificar os efeitos individuais, interações entre as variáveis, avaliação de erros experimentais e o equacionamento empírico dos resultados.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Melaço de soja

O melaço de soja foi obtido pela empresa processadora de soja Selecta, localizada em Araguari - MG. As amostras foram estocadas em recipientes de plástico em um freezer a -4°C . Antes da utilização do melaço de soja, as amostras foram descongeladas naturalmente até temperatura ambiente. A Figura 3.1 ilustra o melaço de soja.



Figura 3.1: Amostra de melaço de soja (foto da autora, 2011).

3.1.2 Levedura

A levedura utilizada nas fermentações alcoólicas foi a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y904 produzida pela Mauri do Brasil na forma seca. Esta cepa de levedura é comercializada no Brasil para partidas de plantas industriais de fermentação alcoólica.

3.1.3 Enzima

A enzima utilizada nos ensaios de hidrólise do melaço de soja foi StartMax® AGSL, cedida pela empresa Prozyn Biosolutions. A StartMax® AGSL (SM) é constituída a base de alfa-galactosidase, produzida por fermentação controlada de *Aspergillus Niger*. A enzima foi estocada sob refrigeração em embalagem fechada. No Anexo 1 segue ficha enviada pelo fabricante com informações sobre a enzima.

3.1.4 Bioreator

Ensaio fermentativos e de hidrólise enzimática do melaço de soja foram realizados em um bioreator batelada modelo *B. Braun Biotech International*, com volume total 2,0 litros e volume útil de 1,5 litros. A Figura 3.2 ilustra a unidade experimental (bioreator), sendo: (1) agitador mecânico; (2) camisa de resfriamento com entrada de água para controle da temperatura e (3) painel de controle.

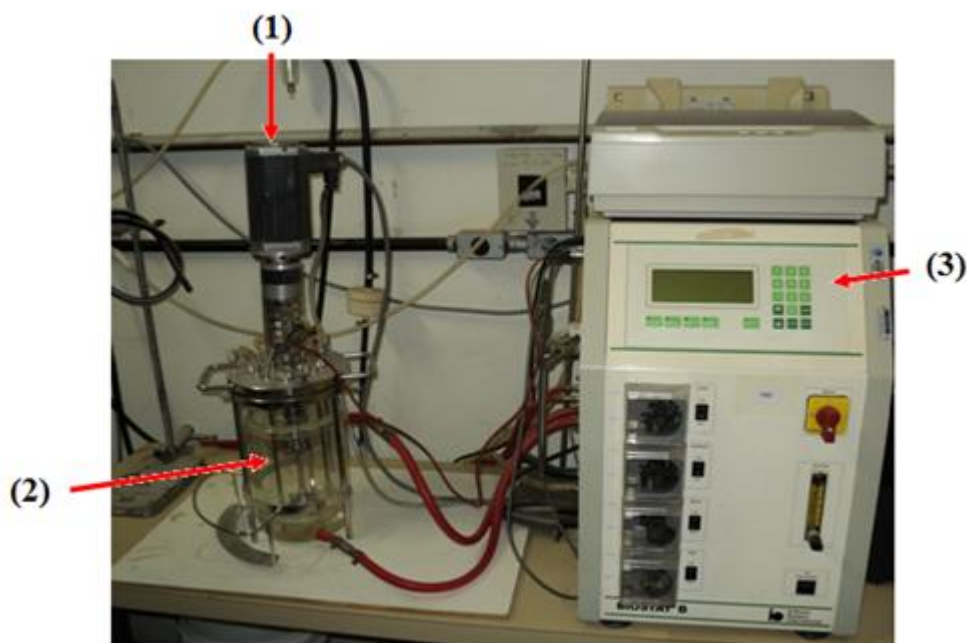


Figura 3.2: Bioreator batelada modelo *B. Braun Biotech International* utilizado em ensaios de fermentação e hidrólise de melaço de soja (foto da autora, 2011).

3.2 Metodologia

3.2.1 Dosagem de Etanol e Açúcares Totais

Etanol e açúcares totais foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A cromatografia líquida é uma técnica de separação física conduzida por uma fase líquida. A amostra é separada em seus componentes constituintes (ou analitos), distribuindo-se entre a fase móvel (líquido que flui) e uma fase estacionária (absorventes embalados dentro de uma coluna). A Figura 3.3 representa um esquema do processo de separação por cromatografia, onde uma mistura dos analitos A e B são separados em duas faixas distintas à medida que migram ao longo da coluna (fase estacionária). Este método é rápido e preciso, tem operação automática, alta sensibilidade de detecção e pode ser aplicado para quantificação de diversas amostras (DONG, 2006).

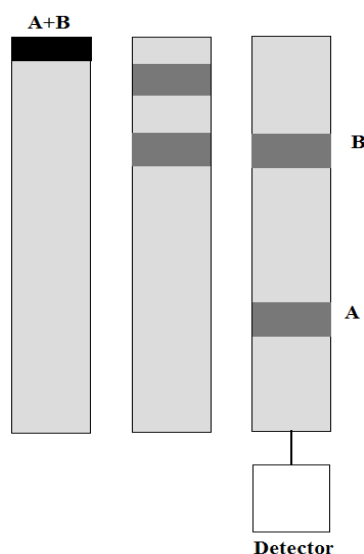


Figura 3.3: Esquema do processo de cromatografia mostrando a migração das bandas de dois componentes na coluna (DONG, 2006).

A quantificação de etanol e açúcares foi realizada com amostras previamente filtradas em HPLC Shimadzu modelo LC-20A Prominence (Figura 3.4), com coluna SUPELCOGEL Ca, água deionizada como fase móvel, fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 µL. O etanol e os açúcares foram determinados a partir de suas respectivas curvas de calibração, conforme Anexo

2. A quantidade de açúcares totais (AT) foi calculada pela soma das concentrações de estaquiose, rafinose, sacarose, glicose e frutose.



Figura 3.4: HPLC Shimadzu modelo LC-20A Prominence utilizado nas análises de açúcar e etanol (foto da autora, 2011).

3.2.2 Contagem de Células

Para acompanhar o crescimento celular ao longo da fermentação utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Nikon). Considerou-se para contagem 16 quadrados que possuem 25 quadrículas com uma área de $0,0025 \text{ mm}^2$ e profundidade de $0,1 \text{ mm}$ para cada quadrícula. Assim o volume total era de $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{L}$ (Figura 3.5).

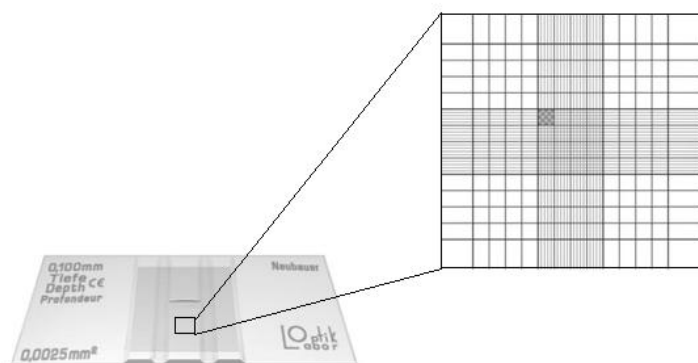


Figura 3.5: Esquema da câmara de Neubauer (BARGA, 2007).

Para a contagem de leveduras, diluiu-se a amostra, promoveu-se a homogeneização com uma vigorosa agitação e fez-se a coloração com duas gotas de solução de azul de metileno 0,1%. A solução foi inserida entre a câmara de Neubauer e a lamínula, por capilaridade, com o auxílio de uma micropipeta estéril. Realizou-se a contagem aumentando 100 vezes o tamanho da câmara. O número de células por mL de solução foi calculado de acordo com a Equação 3.1.

$$N^{\circ} cel / mL = \left\{ \frac{[N_{total} * (1/vol) * D]}{Ret} \right\} * 1000 \quad (3.1)$$

Sendo,

Ntotal: número total de células sem coloração (vivas)

Vol: volume do retículo

D: diluição

Ret: número de retículos

A Figura 3.6 refere-se a uma foto tirada para a leitura em câmara de Neubauer de leveduras.

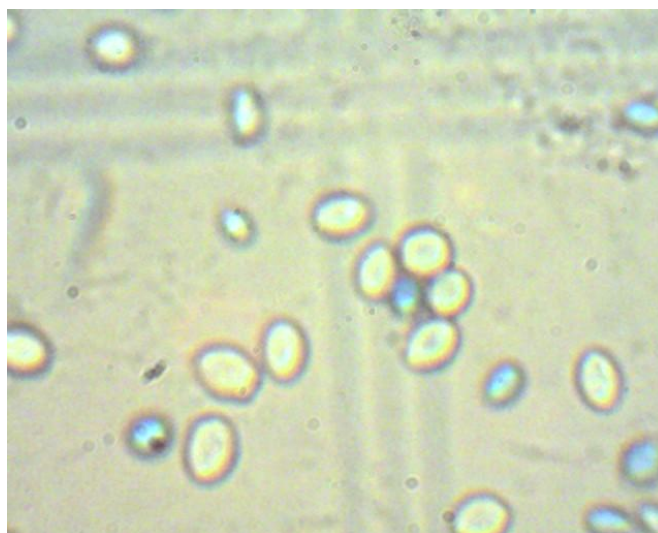


Figura 3.6: Leitura de leveduras *Sacharomyces cerevisiae* na câmara de Neubauer (foto da autora, 2011).

3.2.3 Preparo de inóculo

O preparo do inóculo foi realizado pesando-se a quantidade necessária de levedura seca para cada concentração e completando em balão volumétrico com água destilada até o volume total. Antes de iniciar a fermentação todas as soluções de inóculo preparadas foram transferidas para erlenmeyers e ficaram em mesa agitadora com agitação de 130 rpm, por duas horas para hidratação.

3.2.4 Cálculo do rendimento das fermentações

O rendimento máximo de etanol a partir do açúcar teórico foi calculado de acordo com a relação estequiométrica representada pela Equação 3.2, ou seja, 100 g de glicose produzem 51,1 g de etanol e 48,9 g de CO₂. O rendimento do etanol sobre o total inicial de açúcares consumidos (Y₁) foi calculado de acordo com a Equação 3.3. O rendimento do etanol sobre o total inicial de açúcares foi calculado de acordo com a Equação 3.4.



$$Y_1(\%) = \frac{C_{\text{etanol}} * 100}{(AT_0 - AT_f) * 0,511} \quad (3.3)$$

$$Y_2(\%) = \frac{C_{\text{etanol}} * 100}{AT_0 * 0,511} \quad (3.4)$$

Sendo, Y o rendimento de etanol formado (%); C_{etanol} a concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação; AT_0 a concentração de açúcares totais no início da fermentação (g/L) e AT_f a concentração de açúcares totais (g/L) ao final da fermentação.

3.2.5 Condução dos experimentos

Foram estudados três processos de fermentação alcoólica do melaço de soja: 1) fermentação do melaço de soja diluído com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*; 2) hidrólise enzimática do melaço de soja com enzima SM e posterior fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*; 3) hidrólise com a enzima SM e fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em processo simultâneo. Para cada situação foram feitos estudos preliminares de diluição, cinéticas de fermentação e/ou hidrólise e avaliação da influência de algumas variáveis por meio de Planejamentos Compostos Centrais (PCC). A Figura 3.7 representa as etapas realizadas neste trabalho.

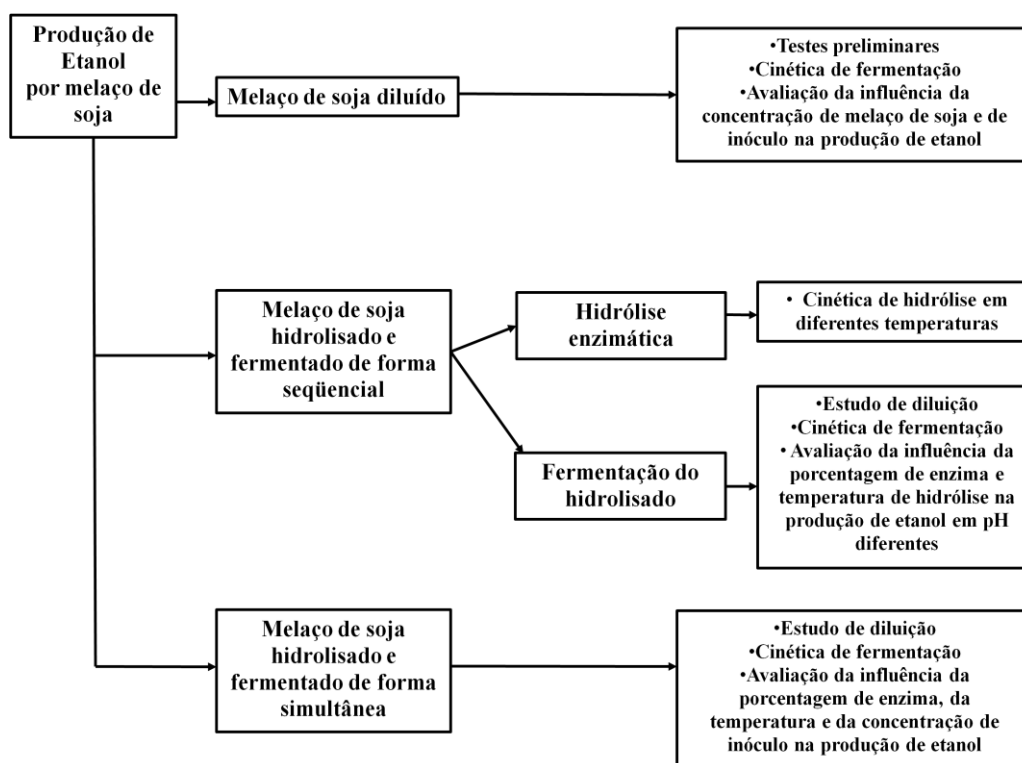


Figura 3.7: Esquema dos processos e experimentos realizados para estudo da produção de etanol por melaço de soja.

3.2.6 Testes preliminares e estudos de concentração

Testes preliminares e estudos de concentração realizados para fermentação após hidrólise do melaço de soja e fermentação e hidrólise simultânea foram realizados em erlenmeyers de 250 mL com volume útil de 100 mL. Os erlenmeyers foram levados a

mesa agitadora por 12 horas, a 35°C, agitação de 130 rpm com uma concentração de 35 g/L de inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para testes de fermentação e hidrólise simultânea adicionou-se também enzima SM na porcentagem 0,050% em relação ao peso do substrato para cada ensaio.

Para cada teste de concentração foram medidas como resposta: açúcares totais no início da fermentação (AT_0), açúcares residuais (AT_t) e dosagem de etanol.

3.2.7 Planejamento Composto Central (PCC)

Na primeira etapa do estudo foi feito por um PCC, onde foi avaliada a influência da concentração de melaço de soja e de inóculo nas respostas das fermentações. Para o segundo processo estudado, onde foi conduzida a hidrólise enzimática e a fermentação em seguida, foram realizados dois planejamentos experimentais em diferentes valores de pH para avaliar como a concentração de enzima e a temperatura de hidrólise influenciavam nas respostas das fermentações. O último PCC foi construído para avaliar como a concentração de enzima, de inóculo e temperatura influenciavam nas respostas de fermentação em processos de hidrólise e fermentação simultâneas.

3.2.7.1 Estudo da influência da concentração de melaço de soja e de inóculo em fermentações com *Saccharomyces cerevisiae*

No software *Statistica* 9.5, foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC): fatorial completo 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos.

Os experimentos foram conduzidos em reator batelada modelo *B. Braun Biotech International*. A temperatura foi fixada em 35°C e o pH foi ajustado com ácido sulfúrico concentrado P.A. para 4,5 para todos os ensaios. O tempo de fermentação foi fixado em 9 horas. A concentração do melaço de soja variou de 520,0 g/L a 180,0 g/L e a concentração de inóculo variou de 18,0 g/L a 52,0 g/L. O alfa de ortogonalidade utilizado no planejamento foi 1,147. As Equações de codificação foram 3.4 e 3.5, para concentração de melaço e concentração de inóculo, respectivamente.

$$X_1 = \frac{C - 350}{150} \quad (3.4)$$

$$X_2 = \frac{I - 35}{15} \quad (3.5)$$

A Tabela 3.1 representa os valores utilizados no Planejamento Experimental para as variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.1: Valores utilizados no planejamento para as variáveis independentes.

	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
(X ₁) Melaço de soja (g/L)	180	200	350	500	520
(X ₂) Inóculo (g/L)	18	20	35	50	52

A faixa de concentração de melaço de soja foi definida a partir do teste preliminar e a faixa de concentração de inóculo foi determinada com base em dados industriais.

A Tabela 3.2 mostra a Matriz do PCC com os valores codificados e reais das variáveis em estudo. Os ensaios foram realizados de forma aleatória, para evitar que os resultados seguissem alguma tendência.

Tabela 3.2: Matriz do PCC com valores originais e codificados das variáveis.

Ensaio	Melaço de soja (g/L)	Inóculo (g/L)
1	200 (-1)	20 (-1)
2	200 (-1)	50 (+1)
3	500 (+1)	20 (-1)
4	500 (+1)	50 (+1)
5	180 (-1,147)	35 (0)
6	520 (+1,147)	35 (0)
7	350 (0)	18 (-1,147)
8	350 (0)	52 (+1,147)
9 (C)	350 (0)	35 (0)
10 (C)	350 (0)	35 (0)
11 (C)	350 (0)	35 (0)

Após a realização das fermentações e obtenção dos dados, analisou-se os resultados estatisticamente para cada resposta obtida.

Para cada experimento foram medidas como resposta: açúcares totais no início da fermentação (AT_0), açúcares residuais (AT_f) e dosagem de etanol. Os rendimentos Y_1 e Y_2 também foram calculados para cada ensaio.

3.2.7.2 Estudo da influência da porcentagem de enzima SM e da temperatura na geração de açúcares fermentescíveis a etanol

Para estudar como a porcentagem de enzima e a temperatura influenciam nas respostas das fermentações, foi realizado outro Planejamento Composto Central: fatorial completo 2^2 , incluindo os 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos, utilizando-se o software *Statistica 9.5*.

Os experimentos foram realizados no reator batelada modelo *B. Braun Biotech International* com pH ajustado para 4,5 e a concentração de melaço de soja determinada através de teste de concentração para melaço de soja hidrolisado. Após a hidrólise, que durou 10 horas para cada teste, as amostras foram levadas a fermentação no mesmo reator com concentração inicial de inóculo de 35 g/L. Como o pH não se alterou durante a hidrólise não foi necessário ajuste.

A quantidade de enzima empregada (X_1) variou de 0,021 a 0,079% em relação ao peso do substrato e a temperatura (X_2) variou de 49,3 a 60,7°C. O alfa de ortogonalidade utilizado no planejamento foi 1,147. As Equações de codificação foram 3.6 e 3.7, para porcentagem de enzima e temperatura, respectivamente.

$$X_1 = \frac{E - 0,050}{0,025} \quad (3.6)$$

$$X_2 = \frac{T - 55,0}{5,0} \quad (3.7)$$

A faixa de trabalho foi escolhida a partir de informações do fabricante, que indicou as melhores faixas de trabalho para porcentagem de enzima e temperatura (Anexo 1). A Tabela 3.3 representa os valores utilizados no PCC para as variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.3: Valores utilizados no planejamento para as duas variáveis independentes.

	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
(X ₁) Enzima SM (%)	0,021	0,025	0,050	0,075	0,079
(X ₂) Temperatura (°C)	49,3	50,0	55,0	60,0	60,7

A Tabela 3.4 apresenta a matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados.

Tabela 3.4: Matriz do PCC utilizado para avaliar a influência da porcentagem de enzima e da temperatura na produção de etanol por melaço de soja hidrolisado.

Ensaio	Enzima (%)	Temperatura (°C)
1	0,025 (-1)	50,0 (-1)
2	0,025 (-1)	60,0 (+1)
3	0,075 (+1)	50,0 (-1)
4	0,075 (+1)	60,0 (+1)
5	0,021 (-1,147)	55,0 (0)
6	0,079 (+1,147)	55,0 (0)
7	0,050 (0)	49,3 (-1,147)
8	0,050 (0)	60,7 (+1,147)
9 (C)	0,050 (0)	55,0 (0)
10 (C)	0,050 (0)	55,0 (0)
11 (C)	0,050 (0)	55,0 (0)

Para avaliar o comportamento das respostas do processo fermentativo em outra condição, o mesmo PCC acima citado foi realizado em outro pH inicial para a hidrólise: 5,5. Nenhuma outra variável foi modificada. Após a hidrólise o pH das amostras foi ajustado para 4,5 antes do início do processo fermentativo.

Para cada experimento foram medidas como resposta: açúcares totais no início da fermentação (AT₀), açúcares residuais (AT_f) e dosagem de etanol. Os rendimentos Y₁ e Y₂ também foram calculados para cada ensaio.

3.2.7.3 Estudo da influência da porcentagem de enzima SM, da concentração de inóculo e da temperatura na produção de etanol em fermentação e hidrólise simultâneas

A hidrólise e fermentação simultânea foi estudada a partir de um Planejamento Experimental que teve como variáveis: porcentagem de enzima empregada, com relação ao peso do substrato, concentração de inóculo e temperatura do processo.

Foi construído um Planejamento Composto Central: fatorial completo 2^3 , incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, utilizando-se o software *Statistica 9.5*.

A quantidade de enzima empregada (X_1) variou de 0,009 a 0,091% em relação ao peso do substrato, a concentração de inóculo (X_2) variou entre 14,7 a 55,3 g/L e a temperatura (X_3) variou de 25,5 a 44,5°C. O alfa de ortogonalidade utilizado no planejamento foi 1,353. Os experimentos foram realizados no reator batelada modelo *B. Braun Biotech International* com pH em 4,5 e concentração determinada por teste de concentração. A faixa de trabalho foi escolhida a partir de informações do fabricante para a enzima (Anexo 1) e a partir de dados anteriores deste trabalho. As Equações 3.8, 3.9 e 3.10 representam as equações de codificação para as variáveis X_1 , X_2 e X_3 , respectivamente. A Tabela 3.5 representa os valores utilizados no PCC para as variáveis independentes analisadas e a Tabela 3.6 refere-se à matriz do Planejamento Experimental para o estudo em questão.

$$X_1 = \frac{E - 0,050}{0,030} \quad (3.8)$$

$$X_2 = \frac{I - 35,0}{15,0} \quad (3.9)$$

$$X_3 = \frac{T - 35,0}{7,0} \quad (3.10)$$

Tabela 3.5: Valores utilizados no planejamento para as três variáveis independentes.

	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
(X ₁) Enzima SM (%)	0,009	0,020	0,050	0,080	0,091
(X ₂) Inóculo (g/L)	14,7	20,0	35,0	50,0	55,3
(X ₃) Temperatura (°C)	25,5	28,0	35,0	42,0	44,5

Tabela 3.6: Matriz do PCC utilizado para avaliar a influência da porcentagem de enzima, da concentração de inóculo e da temperatura na produção de etanol por melaço de soja em processo de hidrólise e fermentação simultânea.

Ensaio	Enzima (%)	Inóculo (g/L)	Temperatura (°C)
1	0,020 (-1)	20 (-1)	28 (-1)
2	0,020 (-1)	20 (-1)	42 (1)
3	0,020 (-1)	50 (1)	28(-1)
4	0,020 (-1)	50 (1)	42 (1)
5	0,080 (1)	20 (-1)	28(-1)
6	0,080 (1)	20 (-1)	42 (1)
7	0,080 (1)	50 (1)	28(-1)
8	0,080 (1)	50 (1)	42 (1)
9	0,009 (-1,353)	35 (0)	35 (0)
10	0,091 (1,353)	35 (0)	35 (0)
11	0,050 (0)	14,7 (-1,353)	35 (0)
12	0,050 (0)	55,3 (1,353)	35 (0)
13	0,050 (0)	35 (0)	25,5 (-1,353)
14	0,050 (0)	35 (0)	44,5 (1,353)
15	0,050 (0)	35 (0)	35 (0)
16	0,050 (0)	35 (0)	35 (0)
17	0,050 (0)	35 (0)	35 (0)

Concluindo os ensaios fermentativos e obtenção dos dados analisou-se os resultados estatisticamente com a ajuda do software *Statistica 9.5* para cada resposta obtida.

Para cada experimento do PCC, foram medidas como resposta: açúcares totais no início da fermentação (AT_0), açúcares residuais (AT_t) e dosagem de etanol. Os rendimentos Y_1 e Y_2 também foram calculados para cada ensaio.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fermentação do melaço de soja diluído

4.1.1 Testes preliminares

Para o estudo da fermentação do melaço de soja diluído foi realizado um teste preliminar para definir uma concentração que proporcionasse maior rendimento da fermentação, visto que a amostra pura é de difícil manejo em laboratório. Assim, foram realizadas fermentações com diferentes concentrações de melaço de soja: 250 g/L, 333 g/L e 500 g/L. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL com volume útil de 100 mL, levados à mesa agitadora por 12 h, a 35°C, 130 rpm e 30 g/L de inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados do teste estão dispostos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Resultados do teste preliminar de fermentações realizadas em diferentes diluições, onde AT_0 é a quantidade de açúcares totais iniciais (g/L), AT_f é a quantidade de açúcares totais finais (g/L) e Y_1 é o rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos (%) e Y_2 é o rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais iniciais, calculados conforme Equação 3.3 e 3.4, respectivamente.

Concentração de melaço de soja (g/L)	AT_0 (g/L)	AT_f (g/L)	Etanol (g/L)	Y_1 (%)	Y_2 (%)
500	306,2	148,1	55,2	68,3	35,3
333	205,3	79,7	45,8	71,4	43,6
250	155,2	60,9	31,2	64,7	39,3

Com os resultados obtidos na Tabela 4.1, observou-se que a solução de melaço de soja 333 g/L rendeu mais etanol com relação aos açúcares totais consumidos e também com relação a concentração inicial de açúcares. Assim, esta foi a concentração escolhida para fermentação do melaço de soja.

Para estudar a cinética da fermentação realizou-se uma fermentação em bioreator (volume útil de 1,5 L) retirando amostras de 2 em 2 horas monitorando o consumo de açúcares totais, o número de células por mL e a produção de etanol para uma solução de

melaço de soja 333 g/L com 30 g/L de inóculo. O pH inicial da fermentação foi ajustado para 4,5 e a agitação foi mantida a 500 rpm. A temperatura foi mantida a 35°C por 12 h. Os dados seguem na Tabela 4.2. A partir desses dados, foi possível construir a Figura 4.1. O volume útil do reator foi de 1,5 L e em cada reator foram retiradas 4 alíquotas de 30 mL de amostra para cada análise.

Tabela 4.2: Dados referentes à fermentação do melaço de soja diluído na concentração de 333 g/L, pH 4,5, 30 g/L de inóculo e agitação de 500 rpm, onde AT = açúcares totais.

Tempo (h)	Etanol (g/L)	AT (g/L)	Número Células/mL	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
0	0	206,9	4,8E8	0	0
2	12,7	175,2	5,2E8	78,4	12,0
4	24,7	140,6	5,7E8	72,9	23,4
6	35,8	109,6	6,0E8	72,0	33,9
8	43,5	88,8	6,8E8	72,1	41,1
9	47,1	77,5	7,4E8	71,2	44,6
10	46,8	78,2	7,9E8	71,2	44,3
11	47,5	76,9	8,2E8	71,5	44,9
12	48,1	75,1	8,4E8	71,4	45,5

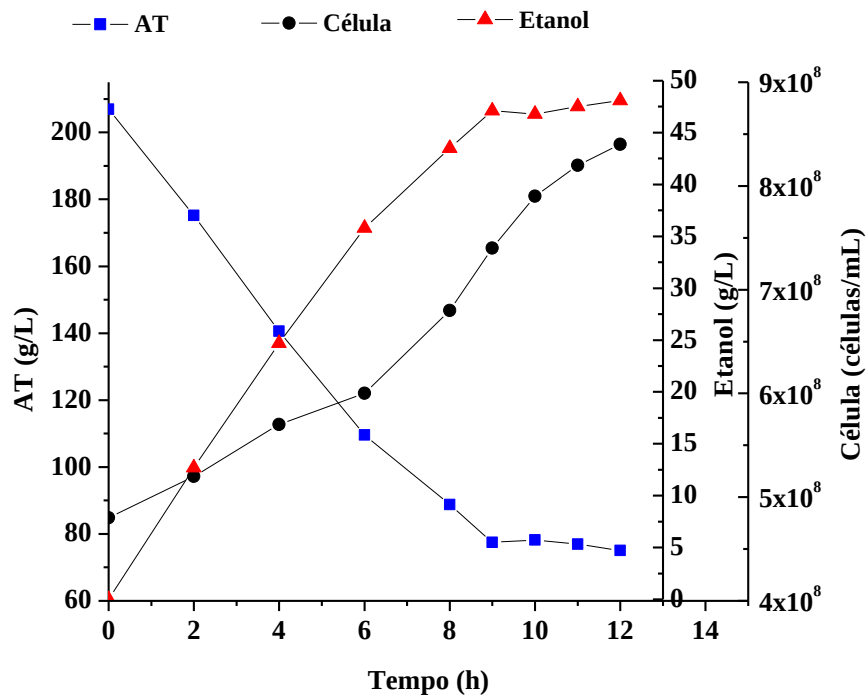


Figura 4.1: Perfis de consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol em função do tempo.

Da Figura 4.1 foi possível observar que com 9 horas de fermentação o processo estabilizou, tanto com relação à produção de etanol e crescimento celular, quanto ao consumo de açúcares. Assim esse tempo foi adotado para a próxima etapa desse estudo.

4.1.2 Avaliação da influência da concentração de melaço de soja e de inóculo na produção de etanol

A partir do teste preliminar (Tabela 4.1) foi possível realizar um Planejamento Composto Central (PCC), onde se estudou como o rendimento Y_1 (%) e a concentração residual de açúcares totais (g/L) são afetados pela concentração inicial de substrato e a concentração de inóculo. Estas variáveis independentes que afetam o desempenho da fermentação alcoólica do melaço de soja foram avaliadas nas faixas: concentração inicial de melaço de soja (180 a 520 g/L) e concentração de inóculo (18 a 52 g/L). Todos os experimentos do planejamento foram realizados em bioreator, com pH inicial 4,5 e tempo de fermentação de 9 horas, determinado pela cinética representada pela Figura 4.1, temperatura de 35°C e rotação de 500 rpm.

A Tabela 4.3 apresenta os valores utilizados no planejamento experimental e as respostas obtidas: concentração de etanol, açúcares totais residuais e os rendimentos, obtidos para cada ensaio.

Tabela 4.3: Matriz do PCC realizado para avaliar a influência da concentração do melaço de soja e da concentração de inóculo no rendimento da produção de etanol por melaço de soja.

Ensaio	Melaço de soja (g/L)	Inóculo (g/L)	AT ₀ (g/L)	AT _f (g/L)	Etanol (g/L)	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
1	200 (-1)	20 (-1)	122,6	57,3	21,1	63,2	33,7
2	200 (-1)	50 (+1)	122,1	56,2	21,7	64,4	34,8
3	500 (+1)	20 (-1)	307,6	151,2	52,6	65,8	33,5
4	500 (+1)	50 (+1)	308,2	147,5	54,7	66,6	34,7
5	180 (-1,147)	35 (0)	110,1	46,1	20,5	62,7	36,4
6	520 (+1,147)	35 (0)	317,5	159,8	51,9	64,4	32,0
7	350 (0)	18 (-1,147)	216,2	88,1	46,1	70,4	41,7
8	350 (0)	52 (+1,147)	214,1	80,1	48,7	71,1	44,5
9 (C)	350 (0)	35 (0)	217,4	75,7	52,8	72,9	47,5
10 (C)	350 (0)	35 (0)	215,1	74,3	52,1	72,4	47,4
11 (C)	350 (0)	35 (0)	216,7	73,7	52,9	72,4	47,8

Observa-se na Tabela 4.3 que o rendimento Y₁ variou de 62,7% (experimento 5) a 72,9% (experimento 9). A concentração de etanol variou entre 21,1 g/L (experimento 1) e 54,7 (experimento 4). A quantidade de açúcares totais residuais variou de 46,1, no experimento 5, a 159,8 g/L (experimento 6). Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas. Pode-se observar também que o maior rendimento de etanol não ocorreu para a maior concentração de substrato presente no meio.

Com os resultados apresentados na Tabela 4.3, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica* 9.5.

4.1.2.1 Rendimento (Y_1)

A partir da análise estatística obtiveram-se parâmetros significativos e não significativos, que deram origem a Equação 4.1. A Tabela 4.4 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta rendimento, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Tabela 4.4: Regressão múltipla para resposta rendimento.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	Desvio	t(5)	P
Termo independente	72,44183	0,249984	289,7864	0,000000
(X_1)Melaço de soja (L)	1,01770	0,177010	5,7494	0,002233
Melaço de soja (Q)	-6,54537	0,244840	-26,7332	0,000001
(X_2)Inóculo (L)	0,42260	0,177010	2,3874	0,062586
Inóculo(Q)	-1,07685	0,244840	-4,3982	0,007034
X_1X_2	-0,10000	0,227945	-0,4387	0,679185
$R^2=0,99$				

$$Y_1(\%) = 72,4418 + 1,0177x_1 - 6,5454x_1^2 + 0,0423x_2 - 1,0768x_2^2 - 0,1000x_1x_2 \quad (4.1)$$

Na Tabela 4.5 estão dispostos os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 5% para a resposta rendimento, após a eliminação de parâmetros não significativos. O parâmetro não significativo, que foi desprezado para o nível de significância adotado, foi a interação entre as duas variáveis (concentração de melaço de soja e concentração de inóculo). A Equação 4.2 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta rendimento.

Tabela 4.5: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.

Variáveis e interações	Coefficientes de regressão	Desvio	t(6)	P
Termo independente	72,44183	0,232553	311,5064	0,000000
(X ₁)Melaço de soja (L)	1,01770	0,164667	6,1803	0,000825
Melaço de soja (Q)	-6,54537	0,227769	-28,7369	0,000000
(X ₂)Inóculo (L)	0,42260	0,164667	2,5664	0,042542
Inóculo(Q)	-1,07685	0,227769	-4,7278	0,003232
R ² =0,99				

$$Y_1(\%) = 72,4418 + 1,0177x_1 - 6,5454x_1^2 + 0,0423x_2 - 1,0768x_2^2 \quad (4.2)$$

Pode-se verificar observando a Equação 4.2 que a interação X_1X_2 não exerceu influência sobre o rendimento. O coeficiente de regressão (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,99, indicando que a equação empírica proposta reproduz com fidelidade os resultados obtidos experimentalmente. Esses resultados indicam excelente concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, como mostra a Figura 4.2.

O sinal positivo dos coeficientes X_1 e X_2 indica que maiores concentrações de melaço de soja e de inóculo contribuem para um aumento do rendimento na produção de etanol. No entanto, há um limite para esse aumento, determinado pelo custo/benefício e pela inibição por substrato (Machado, 1999).

Pela Figura 4.3 pode-se observar que os resíduos, ou erros, se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta rendimento.

Observa-se pela tabela de ANOVA para o rendimento (Y_1) (Tabela 4.6) que o F_{calc} para a regressão é altamente significativo, sendo 48,9 vezes maior que o F_{tab} , o que torna o modelo obtido aceitável.

Tabela 4.6: Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	160,6002	4	40,15	
Resíduo	1,087029	6	0,1811	221,61
Total	161,6873	10	40,33123	
$F_{4,6;0,05} = 4,53$				

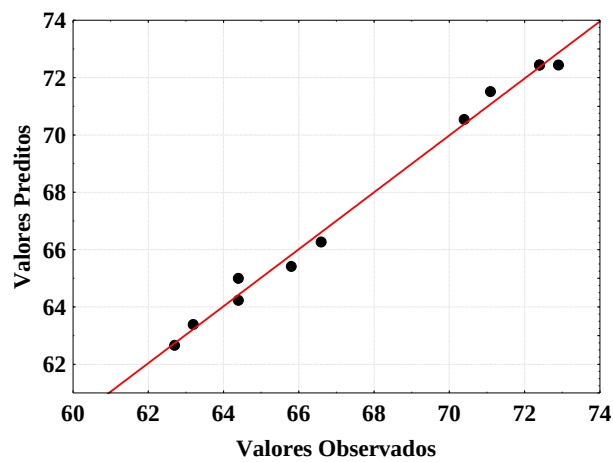


Figura 4.2: Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para rendimento.

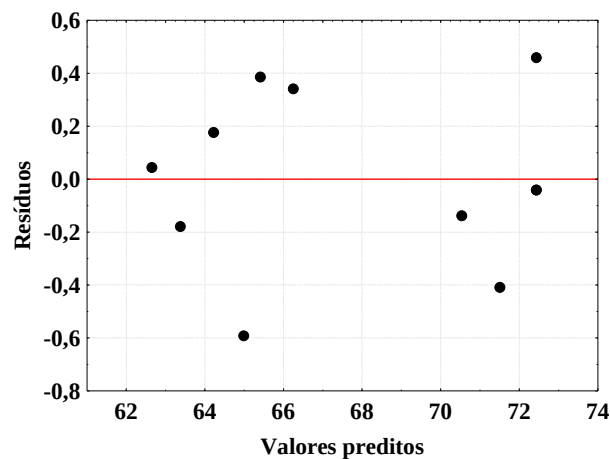


Figura 4.3: Distribuição dos resíduos para rendimento.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.4 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_2 para o rendimento.

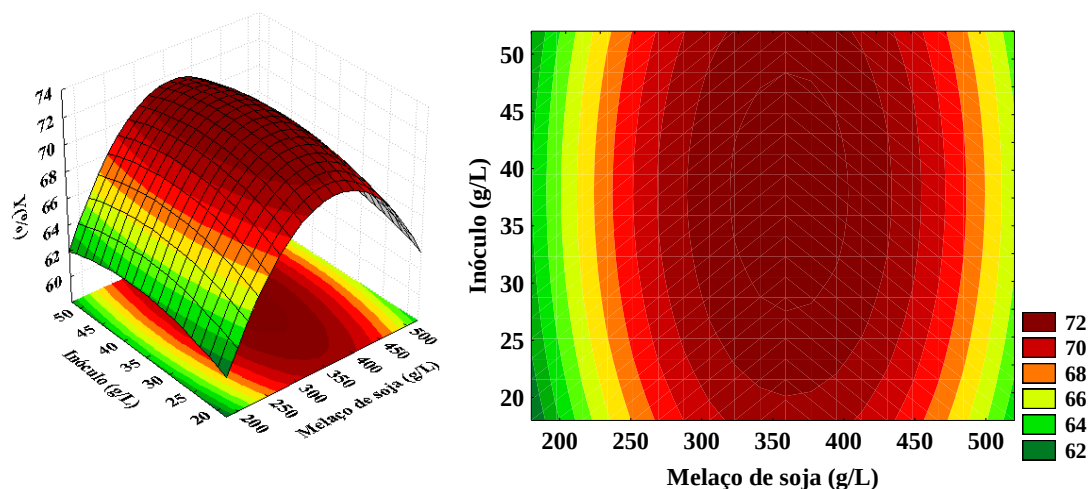


Figura 4.4: Superfície de reposta e curvas de contorno para o rendimento em função das concentrações de melaço de soja e de inóculo.

Observando a Figura 4.4, definiu-se a concentração de melaço de soja e de inóculo que maximizam o rendimento da fermentação alcoólica de melaço de soja na região experimental trabalhada. A faixa aproximada de concentração de melaço de soja que correspondente ao máximo rendimento encontra-se entre 330 e 400 g/L. Para a concentração de inóculo, a faixa melhor para o rendimento está entre 30 e 45 g/L.

4.1.2.2 Açúcares totais residuais

A segunda resposta analisada foi a concentração de açúcares totais residuais, ou seja, a concentração de açúcares no meio depois das nove horas de fermentação.

A Tabela 4.7 reúne os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos, além dos níveis de significância, desvio e valor do teste de *t de student* associado a cada variável e interação para os açúcares totais residuais.

A Equação do modelo, considerando parâmetros significativos e não significativos é apresentado na Equação 4.3.

Tabela 4.7: Regressão múltipla para a resposta açúcares totais residuais.

Variáveis e interações	Coefficientes de regressão	Desvio	t(5)	p
Termo independente	74,62616	1,279757	58,31277	0,000000
(X ₁) Melaço de soja (L)	47,58822	0,906178	52,51531	0,000000
Melaço de soja (Q)	21,41339	1,253431	17,08382	0,000013
(X ₂) Inóculo (L)	-2,10750	0,906178	-2,32570	0,067572
Inóculo (Q)	7,09641	1,253431	5,66159	0,002390
X ₁ X ₂	-0,65000	1,166934	-0,55702	0,601529
R ² = 0,99				

$$AT_f (g / L) = 74,6262 + 47,5882x_1 + 21,4134x_1^2 - 2,1075x_2 + 7,0961x_2^2 - 0,6500x_1x_2 \quad (4.3)$$

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, com $p > 0,05$, foram obtidos os coeficientes apresentados na Tabela 4.8. A Equação 4.4 é resultado do ajuste da Tabela 4.8. A interação entre as duas variáveis (X₁X₂) não exerceu influência na resposta para açúcares totais residuais, sendo variável não significativa. Nota-se na Equação 4.4, pela grandeza do coeficiente que acompanha X₁, a forte influência da concentração de melaço de soja na resposta de açúcar residual.

Tabela 4.8: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta açúcares totais residuais.

Variáveis e interações	Coefficientes de regressão	Desvio	t(5)	p
Termo independente	74,62616	1,279757	58,31277	0,000000
(X ₁) Melaço de soja (L)	47,58822	0,906178	52,51531	0,000000
Melaço de soja (Q)	21,41339	1,253431	17,08382	0,000013
(X ₂) Inóculo (L)	-2,10750	0,906178	-2,32570	0,067572
Inóculo (Q)	7,09641	1,253431	5,66159	0,002390
R ² = 0,99				

$$AT_f(g/L) = 74,6262 + 47,5882x_1 + 21,4134x_1^2 - 2,1075x_2 + 7,0961x_2^2 \quad (4.4)$$

O coeficiente de regressão (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,99, indicando que a equação proposta reproduz os resultados obtidos experimentalmente. A Figura 4.5 representa o gráfico dos valores observados em função dos valores preditos. Observa-se na figura citada que os resultados estão em concordância. Observa-se também na Figura 4.6 que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno do zero, não apresentando comportamento tendencioso.

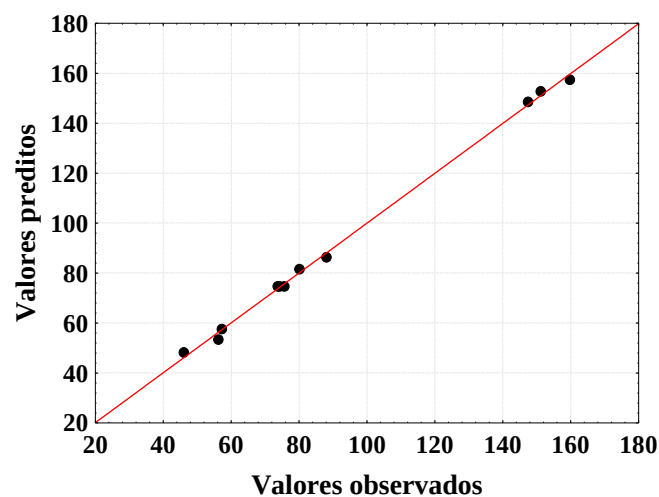


Figura 4.5: Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para açúcares totais residuais.

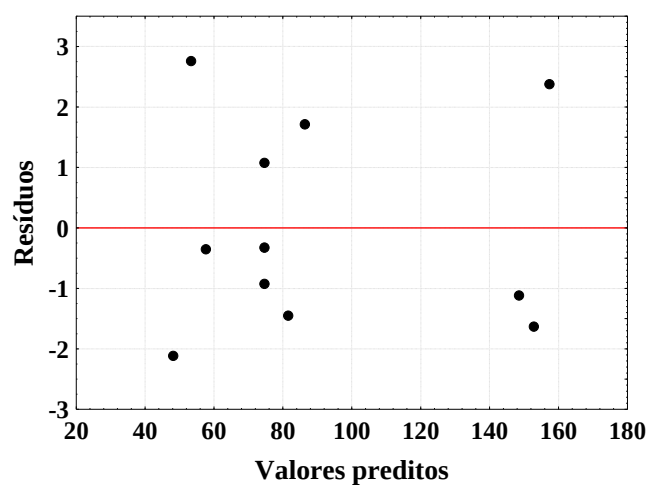


Figura 4.6: Distribuição dos resíduos para açúcares totais residuais.

Observando o quadro de ANOVA (Tabela 4.9) é possível concluir que o modelo ajustado para a resposta açúcares residuais é significativo ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$).

Tabela 4.9: Análise de variância para a resposta açúcares totais ao final da fermentação (AT_f).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	16815,46	4	4203,865	
Resíduo	29,13474	6	4,855791	865,7427
Total	16844,60	10	4208,721	
$F_{4,6;0,05} = 4,53$				

Foi possível construir a superfície de resposta e a curva de contorno para a resposta açúcares residuais em função da concentração de melaço de soja (X_1) e de inóculo (X_2) (Figura 4.7).

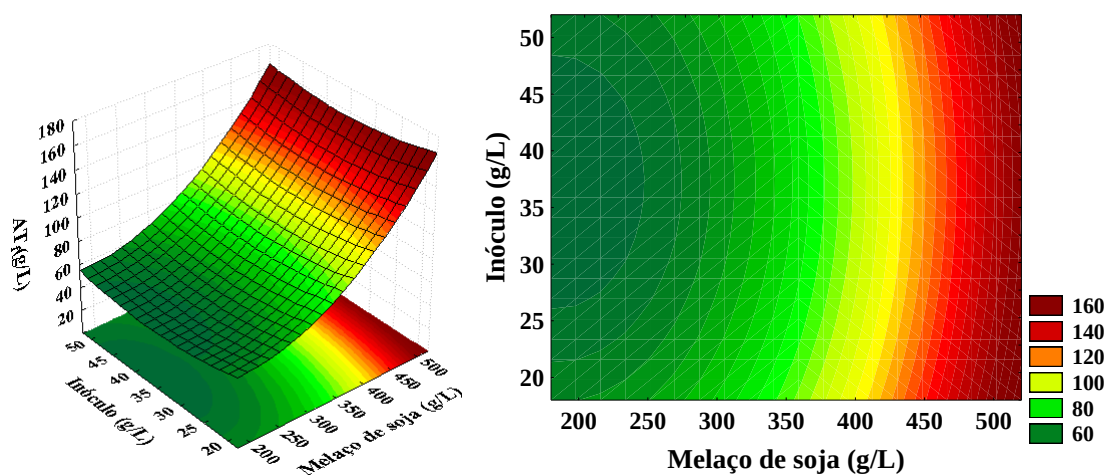


Figura 4.7: Superfície de resposta e curva de contorno para açúcares residuais em função da concentração de melaço de soja e inóculo.

Da Figura 4.7, definiu-se a concentração de melaço de soja e de inóculo que minimizam a concentração de açúcares totais residuais pós fermentação alcoólica de melaço de soja. A faixa aproximada de concentração de melaço de soja que

correspondente ao mínimo de açúcares encontra-se entre 180 e 250 g/L. Para a concentração de inóculo, a faixa melhor para o rendimento está entre 25 e 45 g/L.

Visando verificar a reprodutibilidade dos resultados, foi realizado um experimento nas mínimas condições definidas para a maximização da resposta produção de etanol, que foi concentração de melaço de soja 330 g/L e de inóculo 30 g/L. Os resultados dos experimentos foram rendimento (Y_1) igual a 71,8 % e concentração de açúcar residual de 69,9 g/L. Adicionando os valores das variáveis codificadas nestas condições nas Equações 4.2 e 4.4 obteve-se os seguintes valores para o rendimento (Y_1) e para a concentração de açúcar residual: 72,1% e 70,2 g/L, respectivamente.

4.2 Fermentação do melaço de soja hidrolisado

4.2.1 Hidrólise enzimática do melaço de soja

A utilização de enzimas para a hidrólise do melaço de soja foi baseada na recomendação do fabricante, que sugeria concentração entre 0,025% e 0,050% em relação ao peso do substrato, pH entre 4,5 e 5,5 e temperatura de 50°C a 60°C.

Foram realizadas cinéticas de hidrólise de soluções de melaço de soja 500 g/L nas temperaturas 45° C, 50° C e 55° C, com 0,050% de enzima com relação ao peso do substrato, pH 4,5, durante 12 horas em reator fechado, com agitação de 500 rpm. As Figuras 4.8, 4.10 e 4.13 representam a hidrólise da estaquiose, rafinose e sacarose para as temperaturas 55° C, 50° C e 45° C, respectivamente. As Figuras 4.9, 4.11 e 4.12 representam a formação dos açúcares glicose e frutose para as mesmas temperaturas, na mesma ordem.

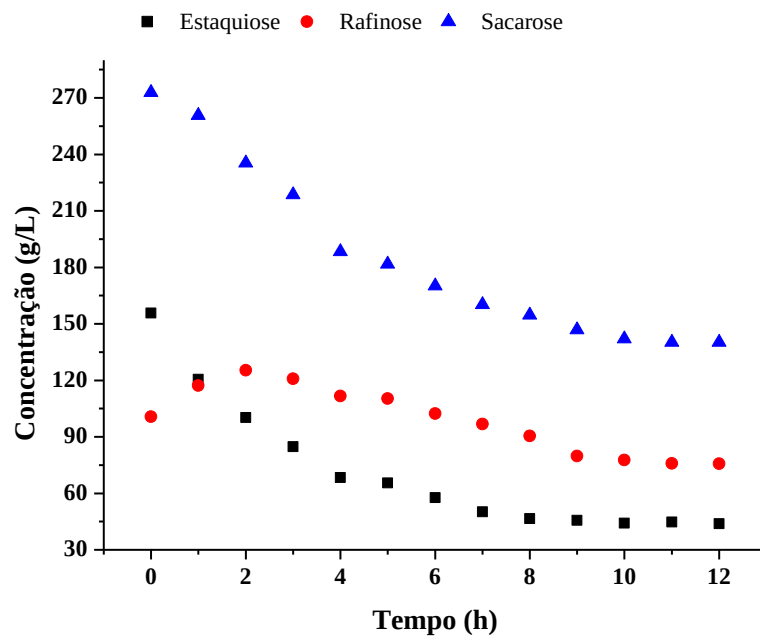


Figura 4.8: Perfis cinéticos de estaquiose, rafinose e sacarose em processo de hidrólise enzimática de solução de melado de soja a 55° C e pH 4,5.

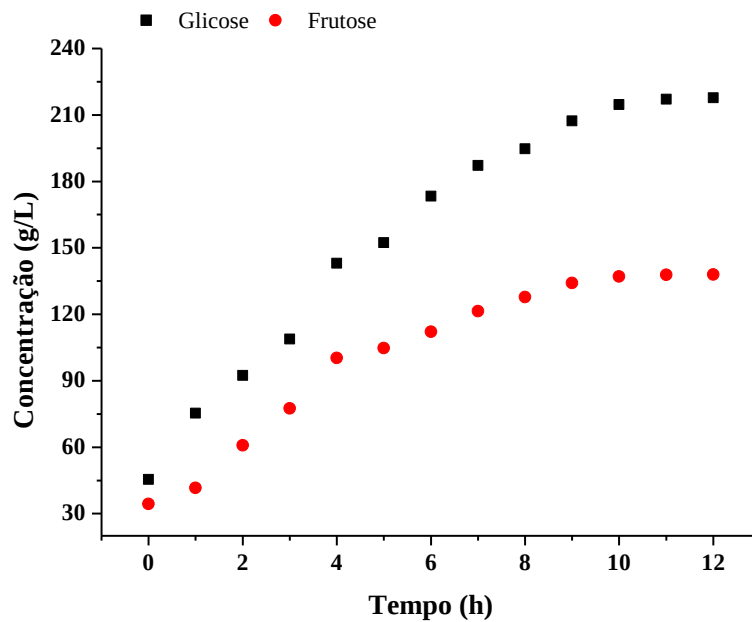


Figura 4.9: Perfis cinéticos de glicose e frutose em processo de hidrólise enzimática de solução de melado de soja a 55° C e pH 4,5.

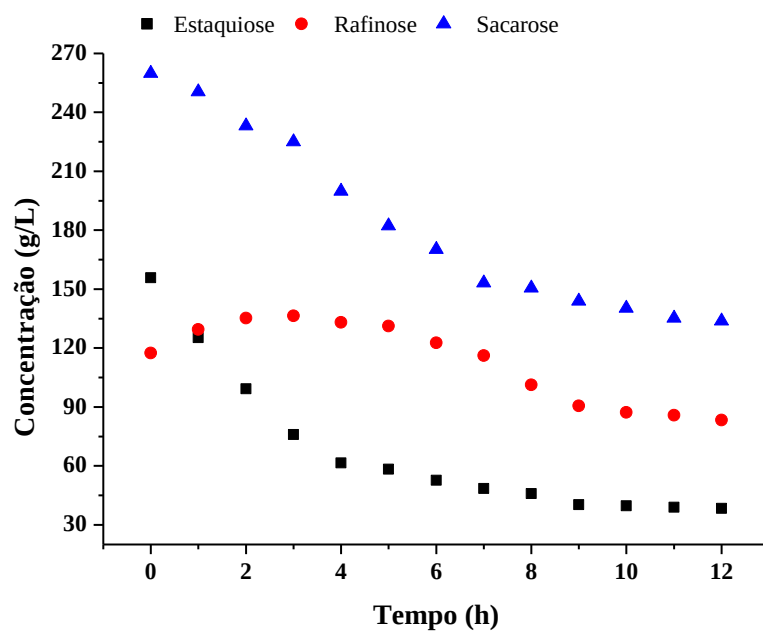


Figura 4.10: Perfis cinéticos de estaquiose, rafinose e sacarose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 50° C e pH 4,5.

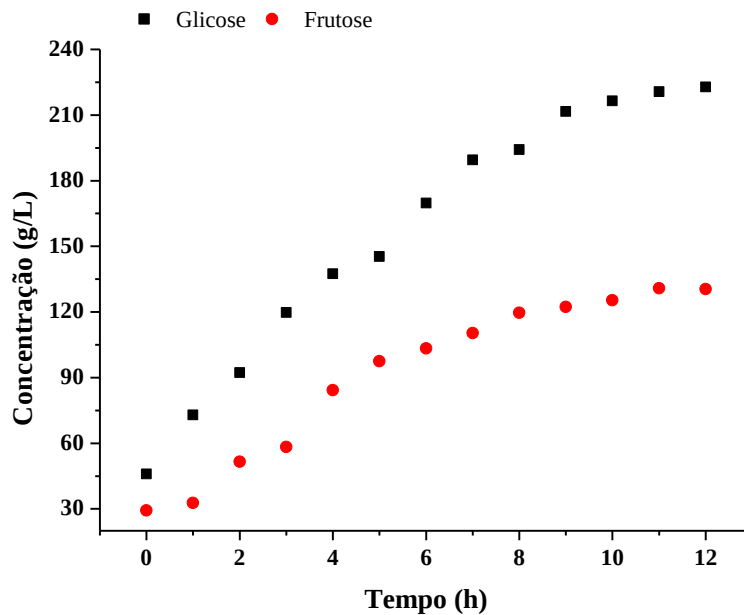


Figura 4.11: Perfis cinéticos de glicose e frutose em processo de hidrólise enzimática de solução de melaço de soja a 50° C e pH 4,5.

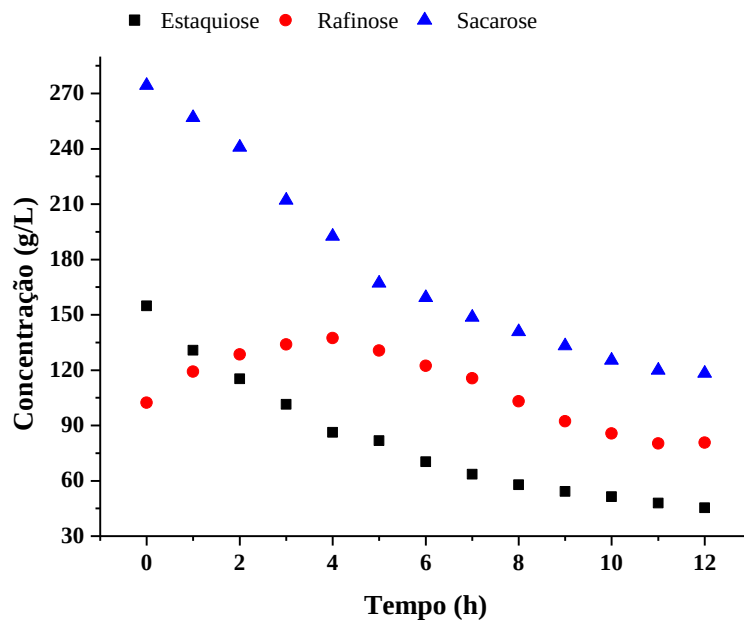


Figura 4.12: Perfis cinéticos de estaquiase, rafinose e sacarose em processo de hidrólise enzimática de solução de melado de soja a 45° C e pH 4,5.

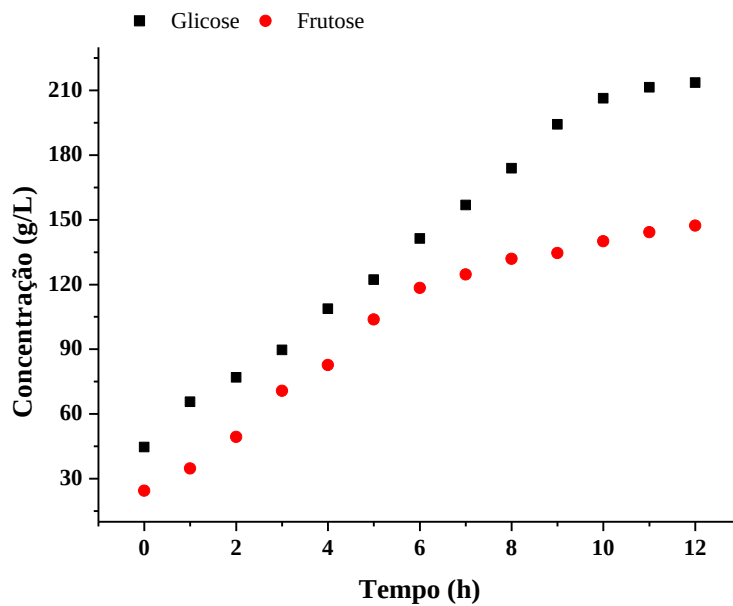


Figura 4.13: Perfis cinéticos de glicose e frutose em processo de hidrólise enzimática de solução de melado de soja a 45° C e pH 4,5.

Analisando as Figuras 4.8 a 4.13, observa-se que a 55° C o processo de hidrólise estabiliza em dez horas, ou seja, os açúcares de cadeia maior (estaquiase, rafinose e sacarose) param de ser quebrados em açúcares menores (glicose e frutose). Já para 50°

C o processo estabiliza em doze horas e para 45° C em doze horas o processo ainda está acontecendo. Observa-se também nas Figuras 4.8, 4.10 e 4.12 que com a diminuição da concentração de estaquiose há um aumento da concentração de rafinose devido à quebra da ligação glicosídica da galactose da extremidade da molécula de estaquiose. Para a temperatura de 55°C a rafinose aumenta até 2 horas e depois diminui, para a temperatura de 50°C a concentração de rafinose aumenta até 2 horas mantém-se estável até 5 horas e depois diminui e para a temperatura de 45°C a concentração de estaquiose aumenta até 4 horas de hidrólise e depois diminui lentamente. Além disso, para todas as temperaturas ocorreu a hidrólise dos açúcares, pois houve a redução na concentração de sacarose, de rafinose e de estaquiose e o aumento na concentração de glicose e frutose. Para os demais ensaios experimentais selecionou-se a temperatura de 55°C devido ao menor tempo de hidrólise.

4.2.2 Fermentação do melaço de soja hidrolisado

4.2.2.1 Teste de diluição para fermentação do melaço de soja hidrolisado

Com a intenção de encontrar a melhor diluição para fermentação do melaço de soja hidrolisado enzimaticamente, realizou-se um teste de diluição variando as concentrações de melaço de soja hidrolisado: melaço de soja *in natura*, 500 g/L, 333 g/L e 250 g/L. As hidrólises foram realizadas por 12 horas, a 55°C com 0,050% de enzima SM, pH 4,5 com agitação de 500 rpm em reator batelada. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers em mesa agitadora por 12 horas, com pH inicial 4,5, 35g/L de inóculo, temperatura de 35°C e agitação de 130 rpm. A Tabela 4.10 reúne os dados do teste realizado.

Tabela 4.10: Dados referentes às fermentações de melaço de soja hidrolisado em diferentes concentrações.

Concentração de melaço de soja (g/L)	AT ₀ (g/L)	AT _f (g/L)	Etanol (g/L)	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
<i>In natura</i>	610,7	499,1	9,9	17,4	3,4
<i>In natura</i>	607,9	491,3	12,7	21,3	4,1
500	308,4	157,1	52,3	67,6	33,2
500	312,4	155,3	55,6	69,3	34,8
333	209,7	58,7	60,1	77,9	56,1
333	211,2	62,4	58,9	77,5	54,6
250	155,9	33,5	50,2	80,3	63,0
250	158,3	32,8	51,5	80,3	63,7

Dos dados da Tabela 4.10 observou-se que da menor concentração de melaço de soja obteve-se o maior rendimento da produção de etanol. Assim a concentração de 250 g/L foi escolhida para continuação dos estudos.

Sabendo das melhores condições de tempo e temperatura para a hidrólise, a fermentação do melaço de soja hidrolisado a 55° C durante 10 horas com 0,05% de enzima com relação ao peso do substrato foi acompanhada com retirada de amostras de tempo em tempo. As condições da fermentação foram: pH 4,5, temperatura de 35° C, inóculo na concentração de 35 g/L, 500 rpm de agitação em reator batelada. Os dados de AT (açúcares totais), células e etanol foram representados na Tabela 4.11. Dos dados da Tabela 4.11 foi construído o gráfico da Figura 4.14.

Tabela 4.11: Dados referentes à fermentação do melaço de soja hidrolisado enzimaticamente na concentração de 250 g/L, pH 4,5, 35 g/L de inóculo e agitação de 500 rpm, onde AT = açúcares totais.

Tempo (h)	AT (g/L)	Número de Células/mL	Etanol (g/L)	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
0	158,9	5,10E+08	0	0	0
0,5	143,8	6,20E+08	5,9	77,0	7,3
1,0	125,9	6,60E+08	13,3	78,9	16,4
1,5	101,4	7,57E+08	24,1	82,0	29,7
2,0	79,1	8,63E+08	34,2	83,9	42,1
2,5	60,9	9,42E+08	41,6	83,1	51,2
3,0	46,5	1,21E+09	47,3	82,3	58,2
3,5	35,9	1,52E+09	51,7	82,2	63,7
4,0	29,9	1,76E+09	53,6	81,3	66,0
4,5	28,6	1,99E+09	53,8	80,1	66,2
5,0	27,2	2,36E+09	52,9	78,6	65,1
6,0	25,5	2,60E+09	54,8	80,4	67,5
7,0	23,1	2,73E+09	54,9	79,1	67,6
8,0	21,7	2,69E+09	54,8	78,2	67,5

Da Figura 4.14 nota-se que a fermentação em termos de produção de etanol estabilizou com 4 horas. Porém, verifica-se que a concentração de açúcar diminuiu lentamente até 7 horas e que o crescimento celular também aumenta lentamente até esse tempo. Este comportamento é muito interessante, pois o tempo de fermentação alcoólica foi muito baixo quando comparado com a fermentação do caldo de cana. Este fato pode estar relacionado à grande quantidade de glicose disponível no meio, o que pode ter facilitado o processo de fermentação da levedura. Assim, o tempo total de processo seria de 14 horas, sendo 10 horas de hidrólise e 4 horas de fermentação.

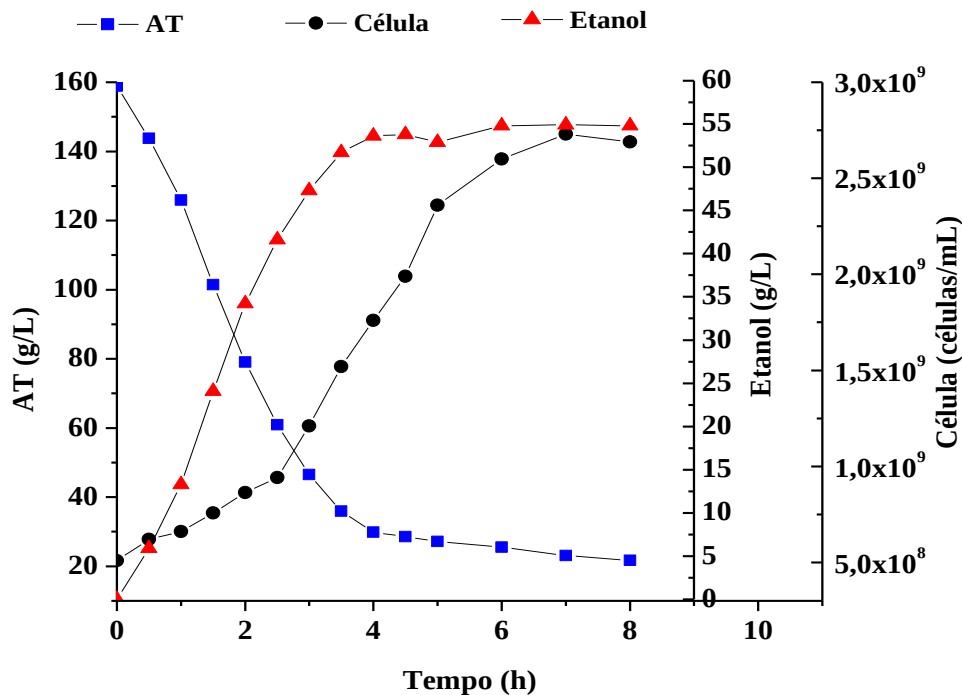


Figura 4.14: Perfis cinéticos de substrato, etanol e crescimento celular em fermentação do melaço de soja hidrolisado enzimaticamente.

4.2.2.2 Avaliação da influência da porcentagem de enzima StarMax AGSL (SM) e da temperatura do processo de hidrólise na produção de etanol em pH 4,5

Tendo o tempo de hidrólise e o tempo de fermentação para o melaço de soja, foi realizado um planejamento experimental que estudou como o rendimento da fermentação do melaço de soja e a quantidade de açúcar residual foram afetados pela porcentagem de enzima em relação ao peso do substrato e a temperatura de hidrólise. Estas variáveis foram avaliadas nas faixas: porcentagem de enzima em relação ao peso do substrato (0,021 a 0,079%), temperatura (49,3 a 60,7° C). Todas as variáveis foram analisadas durante 10 horas de hidrólise e 4 horas de processo fermentativo. O pH foi fixado em 4,5 para a hidrólise e para a fermentação. A Tabela 4.12 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas rendimento Y_1 (%). Observa-se que o rendimento variou de 73,7% (experimento 2) a 80,5% (experimento 11). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas, indicando uma boa reprodutibilidade do processo. Pode-se observar que o maior rendimento de etanol ocorreu para a hidrólise nas condições do

ponto central: 0,05% de enzima e 55°C. Foi considerado um nível de significância de 95%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0,05$.

Tabela 4.12: Variáveis utilizadas no PCC e suas respostas para o pH de 4,5.

Ensaio	Enzima (%)	T (°C)	AT ₀ (g/L)	AT _f (g/L)	Etanol (g/L)	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
1	0,025 (-1)	50,0 (-1)	155,7	56,8	37,9	75,0	47,6
2	0,025 (-1)	60,0 (+1)	158,7	50,9	40,6	73,7	50,1
3	0,075 (+1)	50,0 (-1)	154,9	51,3	40,2	75,9	50,8
4	0,075 (+1)	60,0 (+1)	156,3	42,8	44,2	76,2	55,3
5	0,021 (-1,147)	55,0 (0)	155,3	29,5	50,7	78,9	63,9
6	0,079 (+1,147)	55,0 (0)	158,1	28,1	53,2	80,1	65,8
7	0,050 (0)	49,3 (-1,147)	157,7	53,6	39,7	74,6	49,3
8	0,050 (0)	60,7 (+1,147)	155,3	46,6	41,9	75,4	52,8
9	0,050 (0)	55,0 (0)	156,8	25,9	53,7	80,3	67,0
10	0,050 (0)	55,0 (0)	157,6	26,2	53,9	80,3	67,0
11	0,050 (0)	55,0 (0)	158,3	25,6	54,6	80,5	67,5

4.2.2.2.1 Rendimento

Com os resultados apresentados na Tabela 4.12, foi possível analisar estatisticamente o comportamento do rendimento das fermentações. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica* 9.5. A partir desta análise, obtendo parâmetros significativos e não significativos, foi obtida a Equação 4.5. A Tabela 4.13 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta rendimento, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Tabela 4.13: Regressão múltipla para rendimento.

Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(5)	p
Termo independente	80,44826	0,241449	333,1900	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	0,72015	0,341933	4,2122	0,008390
Enzima(Q)	-0,85626	0,472964	-3,6208	0,015207
(X ₂) Temperatura (L)	-0,01237	0,341933	-0,0723	0,945129
Temperatura (Q)	-4,27410	0,472964	-18,0737	0,000010
X ₁ X ₂	0,40000	0,440325	1,8168	0,128933
R ² =0,99				

$$Y_1(\%) = 80,44826 + 0,72015x_1 - 0,85626x_1^2 - 0,01237x_2 - 4,27410x_2^2 + 0,40000x_1x_2 \quad (4.5)$$

Após a eliminação de parâmetros não significativos foi possível construir a Tabela 4.14 com os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 5% para a resposta rendimento. A Equação 4.6 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta rendimento.

Tabela 4.14: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.

Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(7)	p
Termo independente	80,44826	0,263012	305,8732	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	0,72015	0,372470	3,8669	0,006156
Enzima (Q)	-0,85626	0,515203	-3,3240	0,012696
(X ₂) Temperatura (Q)	-4,27410	0,515203	-16,5919	0,000001
R ² =0,98				

$$Y(\%) = 80,44826 + 0,72015x_1 - 0,85626x_1^2 - 4,27410x_2^2 \quad (4.6)$$

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,98, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 98% da variabilidade dos dados.

As Figuras 4.15 e 4.16 mostram a distribuição dos resíduos em torno do zero e a representação dos valores previstos em função dos valores experimentais, respectivamente.

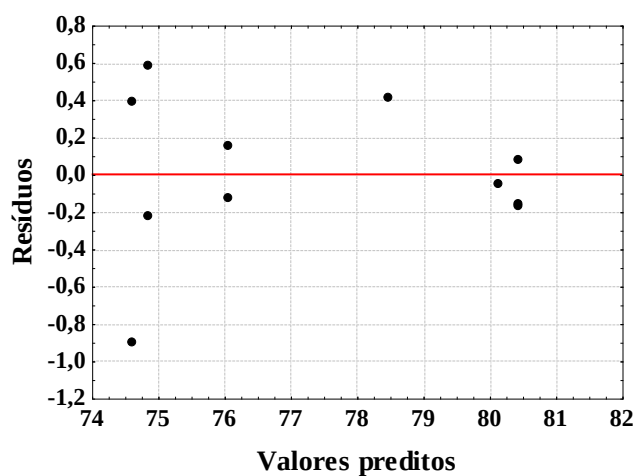


Figura 4.15: Distribuição dos resíduos para rendimento.

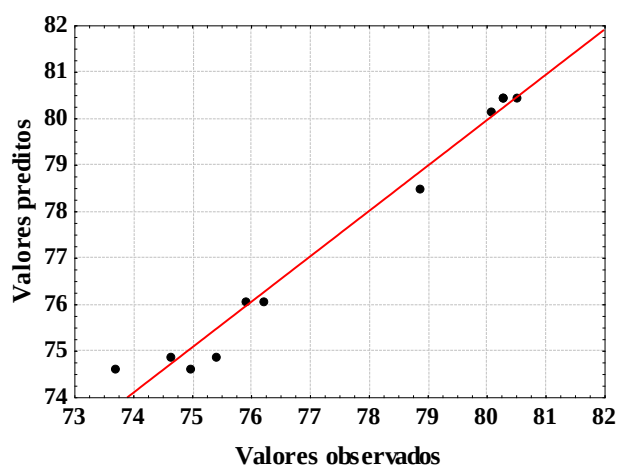


Figura 4.16: Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para rendimento.

Observando a análise de variância para o rendimento de etanol (Y_1) na Tabela 4.15, é possível concluir que o modelo representa com fidelidade os dados experimentais. O F_{calc} é 23,1 vezes maior que o F_{tab} .

Tabela 4.15: Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}
Regressão	69,32081	3	23,10694	100,6859
Resíduo	1,606466	7	0,2294951	
Total	70,92727	10	23,33643	
F _{3,7;0,05} = 4,35				

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.17 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_2 para o rendimento.

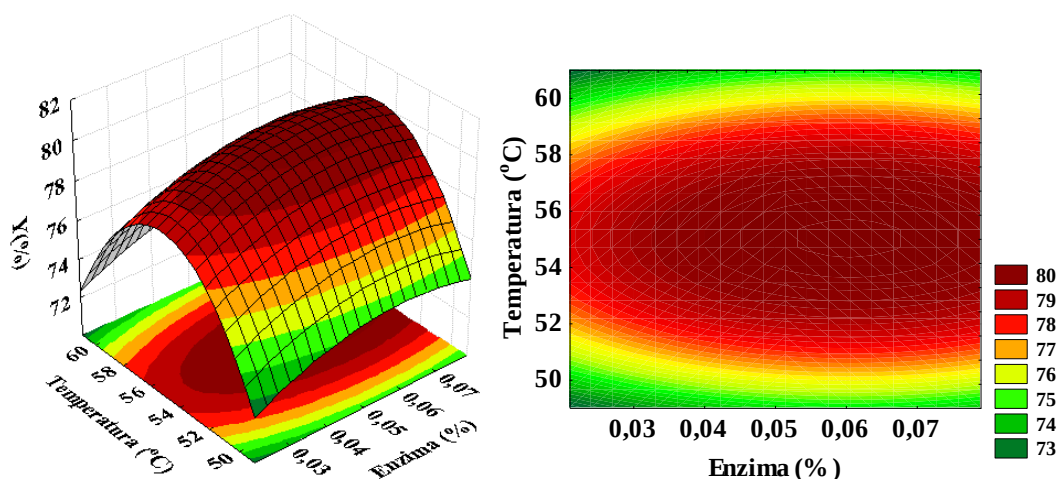


Figura 4.17: Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de enzima e a temperatura para o rendimento da produção de etanol por melaço de soja em %.

A partir da Figura 4.17, definiu-se a porcentagem de enzima e a temperatura que maximizam o rendimento na região experimental trabalhada. A faixa aproximada de enzima correspondente ao máximo rendimento encontra-se entre 0,050 e 0,080% em relação ao peso do substrato. Para a temperatura, a faixa que maximiza o rendimento está entre 54,0 e 56,5°C.

4.2.2.2 Açúcares totais residuais

Também foi avaliada a concentração de açúcar residual com relação à porcentagem de enzima e a temperatura de hidrólise do melaço de soja. Os dados de regressão múltipla para a resposta em questão foram dispostos na Tabela 4.16. A partir dos dados desta tabela, que têm variáveis e interações significativas e não significativas foi construída a Equação 4.7.

Tabela 4.16: Regressão múltipla para a concentração de açúcares totais residuais.

	Coeficiente de regressão	Desvio	t(5)	p
Termo independente	25,15127	1,347339	18,66736	0,000008
(X ₁) Enzima (L)	-2,29246	0,954032	-2,40291	0,061399
Enzima (Q)	4,01952	1,319623	3,04596	0,028556
(X ₂) Temperatura (L)	-3,38177	0,954032	-3,54471	0,016480
Temperatura (Q)	20,19732	1,319623	15,30537	0,000022
X ₁ X ₂	-0,65000	1,228559	-0,52908	0,619390
R ² =0,98				

$$AT_f (g / L) = 25,1513 - 2,2925x_1 + 4,0195x_1^2 - 3,3818x_2 + 20,1973x_2^2 - 0,6500x_1x_2 \quad (4.7)$$

Eliminando as variáveis e interações que não se mostraram significativas, construiu-se uma nova Tabela 4.17, que mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 5% para açúcares totais residuais. A equação do modelo, considerando apenas os parâmetros significativos é dada pela Equação 4.8.

Tabela 4.17: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para açúcares totais residuais.

	Coefficiente de regressão	Desvio	t(6)	p
Termo independente	25,15127	1,263907	19,89962	0,000001
(X ₁) Enzima (L)	-2,29246	0,894955	-2,56153	0,042820
Enzima (Q)	4,01952	1,237907	3,24703	0,017532
(X ₂) Temperatura (L)	-3,38177	0,894955	-3,77870	0,009194
Temperatura (Q)	20,19732	1,237907	16,31570	0,000003
R ² =0,98				

$$AT_f(g/L) = 25,1513 - 2,2925x_1 + 4,0195x_1^2 - 3,3818x_2 + 20,1973x_2^2 \quad (4.8)$$

Obteve-se, após a retirada dos parâmetros não significativos, um coeficiente de correlação (R^2) de 0,98, indicando que os resultados são explicados pela equação empírica proposta com 98% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma ótima concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.18. Os resíduos também se distribuíram de forma aleatória indicando que o modelo é não tendencioso (Figura 4.19).

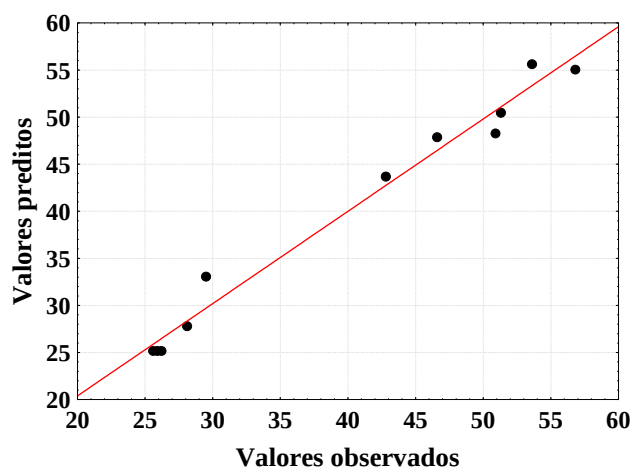


Figura 4.18: Valores preditos e valores experimentais para o modelo.

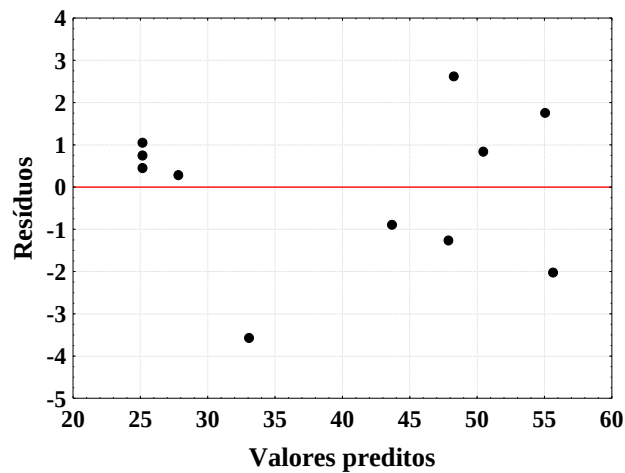


Figura 4.19: Distribuição dos resíduos para a resposta açúcares residuais.

Pode-se notar a partir dos dados da Tabela 4.18 que o F_{calc} para açúcares residuais também é maior que o F_{tab} , o que torna o modelo válido.

Tabela 4.18: Análise de variância para a resposta açúcares totais no final da fermentação (AT_f).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}
Regressão	1581,201	4	395,3002	74,80437
Resíduo	31,70672	6	5,284453	
Total	1612,907	10	400,5846	
F _{4,6;0,05} = 4,53				

A Figura 4.20 representa a superfície de resposta e a curva de contorno para o modelo.

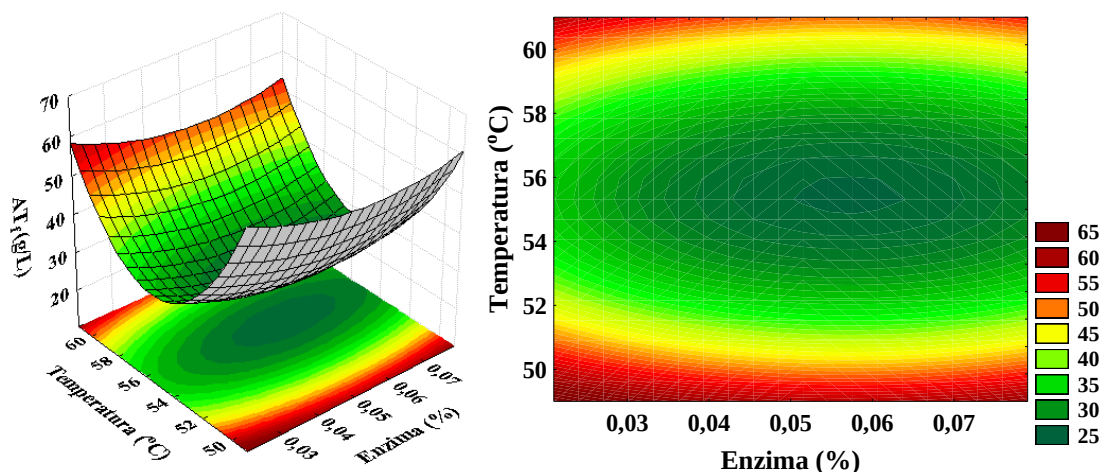


Figura 4.20: Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de enzima e a temperatura para a concentração de açúcares residuais na produção de etanol por melaço de soja.

As faixas que minimizam a concentração de açúcares totais residuais estão compreendidas entre 0,045 e 0,070% para enzima SM e 54 e 57°C para temperatura.

4.2.2.3 Avaliação da influência da porcentagem de enzima StarMax AGSL (SM) e da temperatura do processo de hidrólise na produção de etanol em pH 5,5

Outro PCC foi realizado avaliando as mesmas variáveis, nas mesmas faixas: porcentagem de enzima SM em relação ao peso do substrato (0,021 a 0,079%), temperatura (49,3 a 60,7° C), com 10 horas de hidrólise e 4 horas de processo fermentativo. Mas nesse planejamento, o pH foi fixado em 5,5 para a hidrólise e 4,5 para a fermentação. A Tabela 4.19 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas rendimento Y (%).

Tabela 4.19: Variáveis utilizadas no PCC e as respostas.

Ensaio	Enzima (%)	T (°C)	AT ₀ (g/L)	AT _f (g/L)	Etanol (g/L)	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
1	0,025 (-1)	50,0 (-1)	155,9	43,1	44,6	77,4	56,0
2	0,025 (-1)	60,0 (+1)	157,3	37,2	48,1	78,8	59,8
3	0,075 (+1)	50,0 (-1)	156,3	39,7	45,9	77,0	57,5
4	0,075 (+1)	60,0 (+1)	157,7	30,6	50,8	78,2	63,0
5	0,021 (-1,147)	55,0 (0)	156,5	43,7	44,9	77,9	56,1
6	0,079 (+1,147)	55,0 (0)	158,2	42,1	45,3	76,4	56,0
7	0,050 (0)	49,3 (-1,147)	157,8	39,7	46,6	77,9	57,8
8	0,050 (0)	60,7 (+1,147)	159,1	30,2	53,1	80,0	65,3
9	0,050 (0)	55,0 (0)	155,3	38,5	47,2	79,1	59,5
10	0,050 (0)	55,0 (0)	156,7	39,3	47,3	78,8	59,1
11	0,050 (0)	55,0 (0)	156,6	38,1	47,5	78,4	59,3

O rendimento variou de 76,4% (experimento 6) a 80,0% (experimento 8). Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas. Pode-se observar também que o maior rendimento de etanol ocorreu para a hidrólise nas condições do experimento 8: 0,05% de enzima e 60,7° C. Foi considerado um nível de significância de 95%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0,05$.

4.2.2.3.1 Rendimento

A partir da regressão múltipla realizada no software *Statistica 9.5* foi possível obter os coeficientes de regressão (Tabela 4.20) e a equação para o modelo (Equação 4.9) avaliando a resposta rendimento.

Tabela 4.20: Regressão múltipla para a resposta rendimento.

Variáveis e interações	Coefficientes de regressão	Desvio	t(5)	p
Termo independente	78,75202	0,199688	394,3762	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	-0,40560	0,141396	-2,8685	0,035054
Enzima (Q)	-1,17161	0,195580	-5,9904	0,001859
(X ₂) Temperatura (L)	0,75217	0,141396	5,3196	0,003141
Temperatura (Q)	0,22181	0,195580	1,1341	0,308181
X ₁ X ₂	-0,06097	0,182083	-0,3348	0,751344
R ² =0,94				

$$Y_1(\%) = 78,7520 - 0,4056x_1 - 1,1716x_1^2 + 0,7522x_2 + 0,2218x_2^2 - 0,0601x_1x_2 \quad (4.9)$$

Eliminando a interação entre as duas variáveis (porcentagem de enzima e temperatura) que não foram significativas, obtiveram-se os dados representados na Tabela 4.21, que geraram a Equação 4.10.

Tabela 4.21: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.

Variáveis e interações	Coefficientes de regressão	Desvio	t(7)	p
Termo independente	78,88578	0,154058	512,0540	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	-0,40560	0,135182	-3,0004	0,019931
Enzima (Q)	-1,17161	0,186985	-6,2658	0,000418
(X ₂) Temperatura (L)	0,75217	0,135182	5,5641	0,000847
R ² =0,92				

$$Y_1(\%) = 78,8858 - 0,4056x_1 - 1,1716x_1^2 + 0,7522x_2 \quad (4.10)$$

A Figura 4.21 representa a distribuição dos resíduos associados ao modelo. Observa-se que estão distribuídos aleatoriamente em torno do zero, indicando que não existe tendência no modelo proposto.

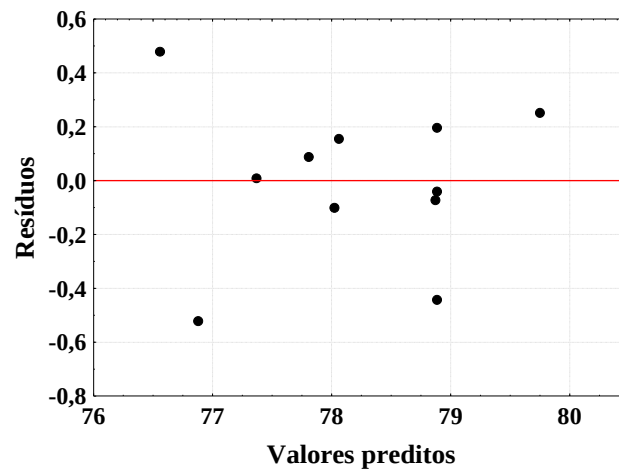


Figura 4.21: Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento.

Os valores observados e valores preditos pelo modelo estão bem próximos e foram dispostos na Figura 4.22.

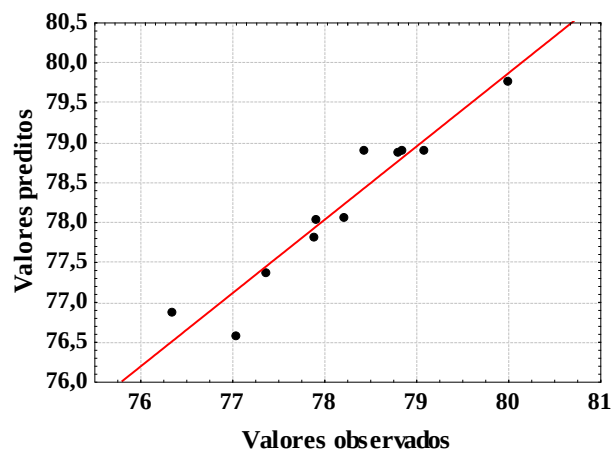


Figura 4.22: Valores experimentais e valores preditos para o modelo.

Do quadro de ANOVA representado pela Tabela 4.22 obteve-se o valor de F_{calc} , que é 6,15 vezes maior que F_{tab} .

Tabela 4.22: Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	9,476438	3	3,158813	26,78967
Resíduo	0,8253811	7	0,1179116	
Total	10,30182	10	3,276725	
$F_{3,7;0,05} = 4,35$				

Como o modelo proposto para a resposta rendimento foi aceitável, foram construídas a superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 4.23).

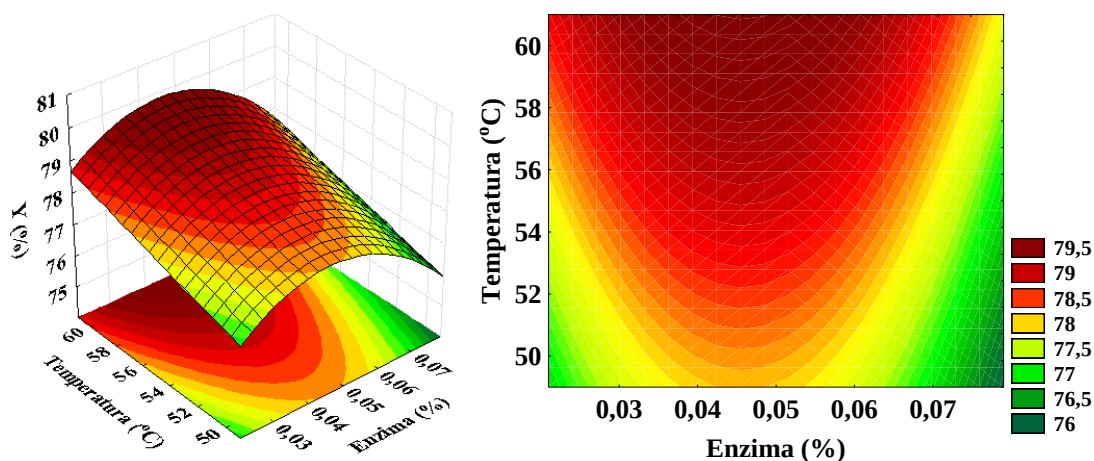


Figura 4.23: Superfície de resposta e curva de contorno para resposta rendimento.

Observando a curva de contorno para o rendimento nota-se que a região que aumenta a resposta está entre 0,035 e 0,055% para porcentagem de enzima SM e temperatura acima de 58°C.

4.2.2.3.2 Açúcares totais residuais

A análise da resposta açúcares totais residuais também foi feita pelo software *Statistica 9.5* a partir dos dados da Tabela 4.15. A Tabela 4.23 representa os coeficientes de regressão obtidos para o modelo que estuda a influência da concentração dos açúcares residuais em relação às condições de hidrólise.

Tabela 4.23: Regressão múltipla para a resposta açúcares totais residuais.

Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(5)	p
Termo independente	38,90255	0,709380	54,84019	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	-1,78433	0,502302	-3,55231	0,016347
Enzima (Q)	2,58733	0,694788	3,72391	0,013657
(X ₂) Temperatura (L)	-3,90468	0,502302	-7,77357	0,000564
Temperatura (Q)	-3,45087	0,694788	-4,96679	0,004223
X ₁ X ₂	-0,80000	0,646842	-1,23678	0,271089
R ² =0,96				

Dos coeficientes de regressão encontrados foi construída a Equação 4.11.

$$AT_f (g / L) = 38,9025 - 1,7843x_1 + 2,5873x_1^2 - 3,9047x_2 - 3,4509x_2^2 - 0,8000x_1x_2 \quad (4.11)$$

Na Tabela 4.24 estão dispostos os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 5% após a eliminação de parâmetros não significativos. O parâmetro não significativo, que foi desprezado para o nível de significância adotado, foi a interação entre as duas variáveis porcentagem de enzima e temperatura de hidrólise.

Tabela 4.24: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta açúcares totais residuais.

Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(6)	p
Termo independente	38,90255	0,740027	52,56911	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	-1,78433	0,524003	-3,40520	0,014403
Enzima (Q)	2,58733	0,724804	3,56969	0,011789
(X ₂) Temperatura (L)	-3,90468	0,524003	-7,45164	0,000301
Temperatura (Q)	-3,45087	0,724804	-4,76111	0,003123
R ² =0,95				

O coeficiente de regressão (R²) obtido após o ajuste foi de 0,95, indicando que a equação proposta reproduz os resultados obtidos experimentalmente. A Equação 4.12 refere-se ao modelo ajustado para açúcares residuais com variáveis e interações significantes.

$$AT_f (g / L) = 38,9025 - 1,7843x_1 + 2,5873x_1^2 - 3,9047x_2 - 3,4509x_2^2 \quad (4.12)$$

A Figura 4.24 representa o gráfico dos valores observados e valores preditos, que estão em concordância. Verifica-se na Figura 4.25 que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno do zero, não apresentando comportamento tendencioso.

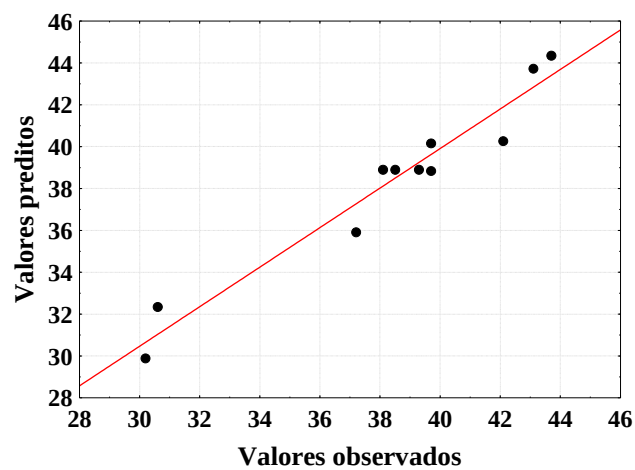


Figura 4.24: Valores observados e preditos do modelo proposto para a resposta açúcares residuais.

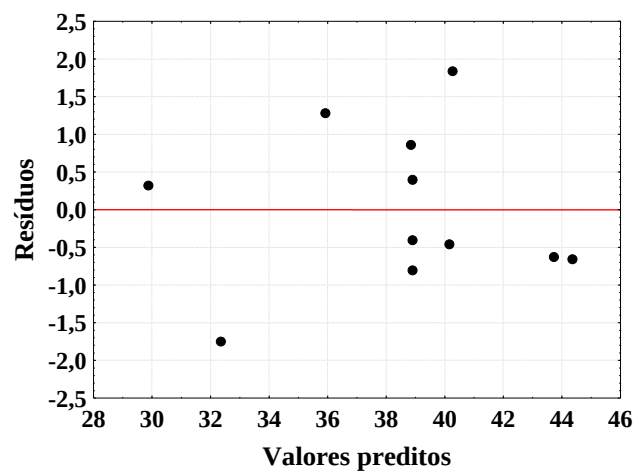


Figura 4.25: Distribuição dos resíduos para a resposta açúcares residuais.

O quadro de ANOVA representada pela Tabela 4.25 indica um F_{calc} bem superior ao tabelado.

Tabela 4.25: Análise de variância para a resposta açúcares totais no final da fermentação (AT_f).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	186,7525	4	46,68812	25,64351
Resíduo	10,92396	6	1,82066	
Total	197,6764	10	48,50878	
$F_{4,6;0,05} = 4,53$				

Do modelo ajustado na Equação 4.12 foi possível construir a superfície de resposta e a curva de contorno para a concentração de açúcares totais residuais (Figura 4.26).

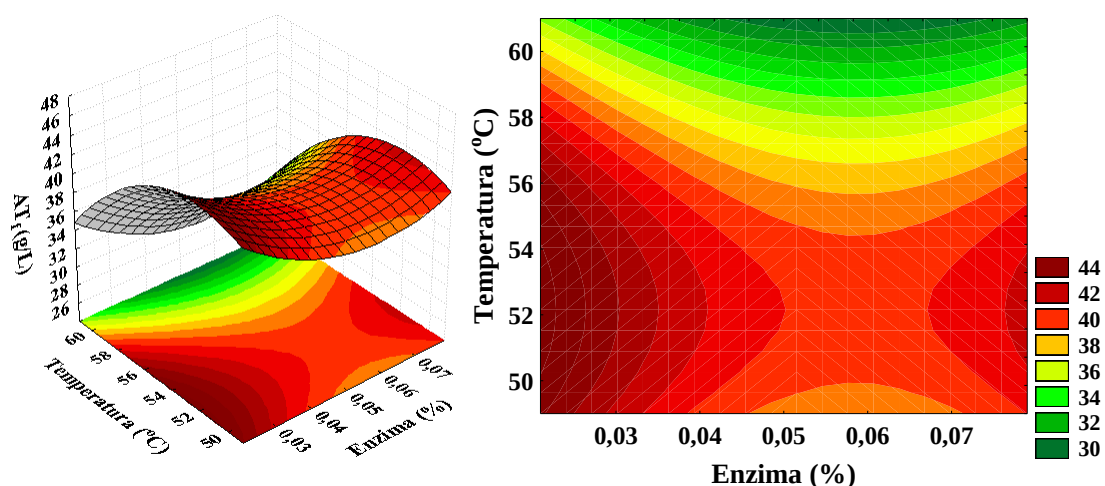


Figura 4.26: Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcares totais residuais.

A região que minimiza a quantidade de açúcares residuais das fermentações do Planejamento Composto Central proposto está entre 0,045 e 0,070% de enzima SM e temperatura acima de 59°C.

Assim selecionou-se o pH 4,5 e a condição do ponto central (concentração de enzima de 0,050% e temperatura de 55°C) para o processo de produção de etanol com hidrólise enzimática em separado. Para confirmar a reprodutibilidade dos resultados foi realizado um experimento nestas condições, os resultados experimentais de produção de etanol, rendimentos Y_1 e Y_2 e de açúcar residual foram respectivamente: 54,8 g/L, 80,8%, 68,1% e 24,9 g/L de açúcar residual, para uma concentração inicial de açúcar

total de 157,8 g/L. A partir das Equações 4.6 e 4.8 obteve-se os valores para o rendimento Y_1 e para a concentração de açúcar residual que foram de 80,4% e 25,1 g/L, respectivamente. Novamente os resultados mostraram reprodutibilidade com relação ao PCC e as condições experimentais selecionadas.

4.3 Hidrólise e Fermentação simultâneas (HFS)

4.3.1 Teste de concentração para o processo de hidrólise e fermentação simultânea (HFS) do melaço de soja

Para o estudo da fermentação simultânea a hidrólise realizou-se um teste que consistiu na condução de fermentações com concentrações diferentes de melaço de soja: 250 g/L (1:2), 333,33 g/L (1:3) e 500 g/L (1:4). Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers levados a mesa agitadora por 12 horas, a 35°C, 130 rpm e 35 g/L de inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e 0,050% de enzima SM. Os resultados do teste estão dispostos na Tabela 4.26.

Tabela 4.26: Resultados do teste preliminar de fermentações e hidrólises simultâneas realizadas em diferentes diluições.

Concentração Melaço de soja (g/L)	AT_0 (g/L)	AT_f (g/L)	Etanol (g/L)	Y_1 (%)	Y_2 (%)
500	310,4	137,1	64,3	72,6	40,5
500	310,4	136,3	63,9	71,8	40,3
333	209,7	56,9	61,1	78,2	57,0
333	209,7	57,4	60,9	78,3	56,8
250	157,3	37,5	49,2	80,4	61,2
250	157,3	36,8	49,5	80,8	61,6

Dos resultados dispostos na Tabela 4.26, observa-se que maiores rendimentos foram obtidos para concentrações menores de melaço de soja, assim a concentração de 250 g/L foi adotada para a fermentação do material hidrolisado.

Com a intenção de definir o tempo de fermentação e hidrólise do melaço de soja foi realizada uma cinética do processo, onde foram coletadas amostras de hora em hora

e analisados açúcares totais, etanol e células (Tabela 4.27). A Figura 4.27 representa o comportamento dos açúcares totais, etanol e células para o experimento.

Tabela 4.27: Dados referentes à cinética de fermentação e hidrólise simultânea do melaço de soja.

Tempo	Etanol (g/L)	AT _f (g/L)	Núm de células/mL	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
0	0	155,7	4,93. 10 ⁸	0	0
1	5,6	142,3	5,30. 10 ⁸	81,8	7,0
2	10,7	130,9	6,35. 10 ⁸	84,4	13,4
3	16,8	115,8	6,89. 10 ⁸	82,4	21,1
4	23,6	99,2	7,62. 10 ⁸	81,7	29,7
5	29,6	85,7	8,19. 10 ⁸	82,8	37,2
6	33,6	74,1	9,22. 10 ⁸	80,6	42,2
7	37,4	65,3	1,12. 10 ⁹	81,0	47,0
8	41,5	57,7	1,28. 10 ⁹	82,9	52,2
9	45,4	47,2	1,35. 10 ⁹	81,9	57,1
10	48,3	38,3	1,40. 10 ⁹	80,5	60,7
11	50,9	32,5	1,43. 10 ⁹	80,9	64,0
12	50,7	32,3	1,42. 10 ⁹	79,8	63,2

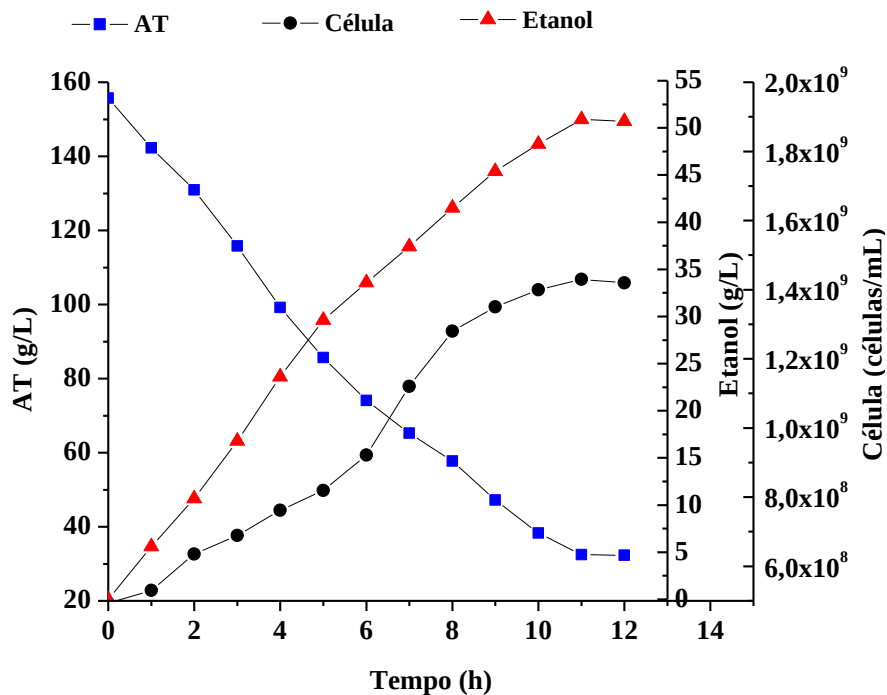


Figura 4.27: Perfis cinéticos de substrato, etanol e crescimento celular em processo de fermentação e hidrólise simultâneas do melaço de soja.

Pela Figura 4.27, conclui-se que o tempo de fermentação e hidrólise enzimática simultânea para o melaço de soja é de 12 horas, pois neste tempo percebe-se que não há mais consumo de açúcares e nem produção de etanol. Assim o tempo total para a produção de etanol com fermentação simultânea foi de 12 horas, que é menor do que o tempo de processo para a hidrólise separada. Na tentativa de melhorar a produção de etanol nesta condição foi proposto um PCC em função da concentração de enzima, de inóculo e da temperatura.

4.3.2 Avaliação da influência da porcentagem de enzima, da concentração de inóculo e da temperatura no processo de hidrólise e fermentação simultânea do melaço de soja

Sabendo da melhor concentração de melaço de soja para a hidrólise e fermentação simultânea (250 g/L) e o tempo necessário para que o processo se estabilize, foi proposto um Planejamento Composto Central para avaliar como a porcentagem de enzima, a concentração de inóculo e a temperatura influenciam no processo de fermentação e hidrólise simultânea do melaço de soja.

As variáveis foram avaliadas nas seguintes faixas: porcentagem de enzima em relação ao peso do substrato (0,009 a 0,091%), concentração de inóculo (14,7 a 55,3 g/L) e temperatura (25,5 a 45,5° C). Todas as variáveis foram analisadas durante 12 horas de hidrólise e processo fermentativo simultâneo. O pH foi fixado em 4,5 e a concentração de melaço de soja em 250 g/L. A Tabela 4.28 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e das respostas. Foi considerado um nível de significância de 95%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0,05$.

Observa-se que o rendimento variou de 72,5% (experimento 14) a 81,1% (experimentos 15 e 16). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa reprodutibilidade do processo. O maior rendimento de etanol ocorreu para a hidrólise nas condições do ponto central: 0,05% de enzima, 35 g/L de inóculo e 35°C.

Com os resultados apresentados na Tabela 4.28, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica* 9.5.

Tabela 4.28: Matriz do PCC realizado para avaliar a influência da porcentagem de enzima, concentração de inóculo e temperatura em fermentação e hidrólise simultânea na produção de etanol por melaço de soja.

Ensaio	Enzima (%)	Inóculo (g/L)	T (°C)	AT ₀ (g/L)	AT _f (g/L)	Etanol (g/L)	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)
1	0,020 (-1)	20 (-1)	28 (-1)	155,4	53,4	39,1	75,0	49,2
2	0,020 (-1)	20 (-1)	42 (1)	155,3	62,9	34,6	73,2	43,6
3	0,020 (-1)	50 (1)	28(-1)	156,9	50,9	42,8	79,0	53,4
4	0,020 (-1)	50 (1)	42 (1)	154,3	56,6	38,3	76,7	48,6
5	0,080 (1)	20 (-1)	28(-1)	158,6	63,3	36,8	75,6	45,4
6	0,080 (1)	20 (-1)	42 (1)	157,4	67,8	33,9	74,0	42,1
7	0,080 (1)	50 (1)	28(-1)	156,7	55,7	40,3	78,1	50,3
8	0,080 (1)	50 (1)	42 (1)	155,9	60,9	36,4	75,0	45,7
9	0,009 (-1,353)	35 (0)	35 (0)	157,5	45,8	42,7	78,4	53,1
10	0,091 (1,353)	35 (0)	35 (0)	157,7	50,9	43,2	79,2	53,6
11	0,050 (0)	14,7 (-1,353)	35 (0)	157,2	53,9	40,9	77,5	50,9
12	0,050 (0)	55,3 (1,353)	35 (0)	158,1	42,7	47,4	80,4	58,7
13	0,050 (0)	35 (0)	25,5 (-1,353)	156,8	63,8	36,3	76,4	45,3
14	0,050 (0)	35 (0)	44,5 (1,353)	155,9	71,7	31,2	72,5	39,2
15	0,050 (0)	35 (0)	35 (0)	157,6	37,3	49,9	81,1	62,0
16	0,050 (0)	35 (0)	35 (0)	155,8	37,1	49,2	81,1	61,8
17	0,050 (0)	35 (0)	35 (0)	156,3	38,9	48,5	80,8	60,7

4.3.2.1 Rendimento

Da análise estatística obtiveram-se parâmetros significativos e não significativos, que deram origem a Equação 4.13. A Tabela 4.29 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta rendimento, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Tabela 4.29: Regressão múltipla para rendimento de fermentação.

Variáveis e interações	Coefficientes de regressão	Desvio	t(7)	p
Termo Independente	80,78256	0,273694	295,1568	0,000000
(X ₁)Enzima (L)	-0,01007	0,154418	-0,0652	0,949837
Enzima (Q)	-0,93044	0,203654	-4,5687	0,002578
(X ₂)Inóculo (L)	1,27974	0,154418	8,2875	0,000073
Inóculo (Q)	-0,84853	0,203654	-4,1665	0,004207
(X ₃)Temperatura (L)	-1,20708	0,154418	-7,8170	0,000106
Temperatura (Q)	-3,30629	0,203654	-16,2348	0,000001
X ₁ X ₂	-0,50000	0,186439	-2,6818	0,031455
X ₁ X ₃	-0,07500	0,186439	-0,4023	0,699481
X ₂ X ₃	-0,25000	0,186439	-1,3409	0,221822
R ² =0,98				

$$Y_1 (\%) = 80,7826 - 0,0101x_1 - 0,9304x_2^1 + 1,2797x_2 - 0,84853x_2^2 - 1,2071x_3 - 3,3063x_3^2 - 0,5000x_1x_2 - 0,0750x_1x_3 - 0,2500x_2x_3 \quad (4.13)$$

Eliminando parâmetros não significativos, foram obtidos os coeficientes de regressão dispostos na Tabela 4.30 e a Equação 4.14.

Pode-se verificar observando a Equação 4.14 que variável X₁ na forma linear e as interações X₁X₃ e X₂X₃ não exerceram influência significativa sobre o rendimento. O coeficiente de regressão (R²) obtido após o ajuste foi de 0,98, indicando que a equação empírica proposta reproduz com fidelidade os resultados obtidos experimentalmente. Esses resultados indicam concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, como mostra a Figura 4.28.

Tabela 4.30: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.

Variáveis e interações	Coefficientes de regressão	Desvio	t(10)	p
Termo Independente	80,78256	0,259131	311,7440	0,000000
Enzima (Q)	-0,93044	0,192818	-4,8255	0,000696
(X ₂)Inóculo (L)	1,27974	0,146202	8,7533	0,000005
Inóculo (Q)	-0,84853	0,192818	-4,4007	0,001334
(X ₃)Temperatura (L)	-1,20708	0,146202	-8,2563	0,000009
Temperatura (Q)	-3,30629	0,192818	-17,1472	0,000000
X ₁ X ₂	-0,50000	0,176519	-2,8326	0,017774
R ² =0,98				

$$Y_1(\%) = 80,7826 - 0,9304x_1^2 + 1,2797x_2 - 0,84853x_2^2 - 1,2071x_3 - 3,3063x_3^2 - 0,5000x_1x_2 \quad (4.14)$$

Na Figura 4.29 pode-se observar que os resíduos, ou erros, se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta rendimento.

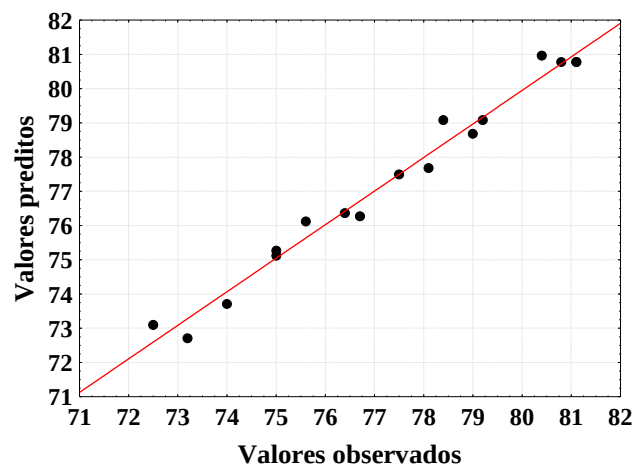


Figura 4.28: Valores experimentais e valores preditos para a resposta rendimento.

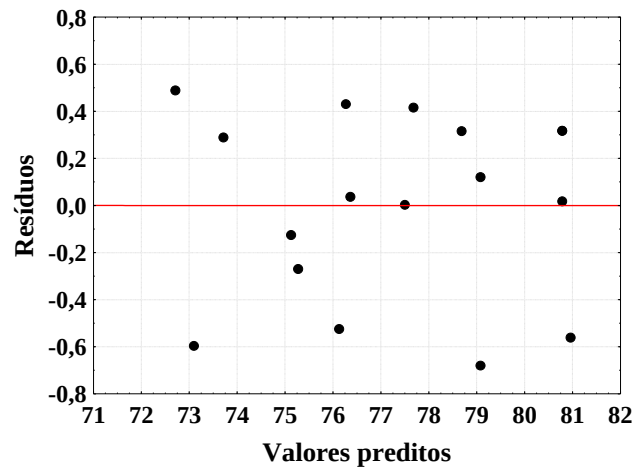


Figura 4.29: Distribuição dos resíduos para a resposta rendimento.

O valor de F_{calc} (81,55783) disponível na Tabela 4.31 é 25 vezes maior que o F_{tab} (3,22), o que valida o modelo proposto para o rendimento fermentativo (Y_1).

Tabela 4.31: Análise de variância para a resposta rendimento (Y_1).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}
Regressão	122,016	6	20,33599	81,55783
Resíduo	2,493444	10	0,2493444	
Total	124,5094	16	20,58534	
F _{6,10;0,05} = 3,22				

Sendo o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.30 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 , X_2 e X_3 para o rendimento.

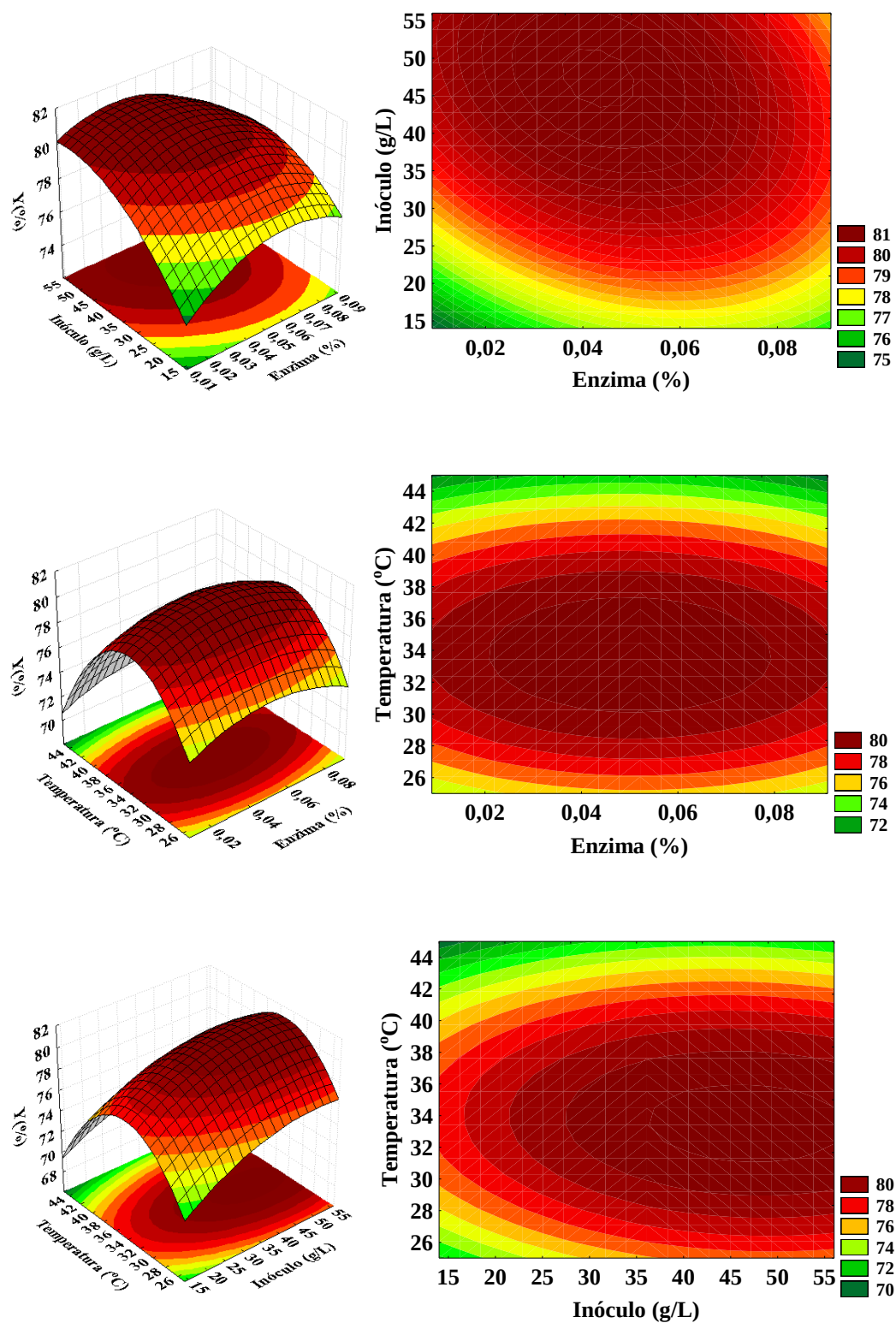


Figura 4.30: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta rendimento.

A Figura 4.30 ilustra os efeitos das variáveis no rendimento fermentativo. As curvas de contorno mostram que o máximo de rendimento se encontra na faixa de 0,035

a 0,060% de enzima SM em relação ao peso do substrato, 35 e 55 g/L de inóculo e entre 32 e 36°C de temperatura.

4.3.2.2 Açúcares totais residuais

A mesma análise estatística foi feita utilizando como resposta a concentração de açúcares residuais das HFS. Obtiveram-se parâmetros significativos e não significativos. A Tabela 4.32 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta rendimento, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Dos dados da Tabela 4.32 foi gerada a Equação 4.15.

Tabela 4.32: Regressão múltipla para rendimento de fermentação.

Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(7)	p
Termo independente	39,79143	1,704655	23,34281	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	2,64114	0,961765	2,74614	0,028663
Enzima (Q)	3,25556	1,268426	2,56661	0,037191
(X ₂) Inóculo (L)	-3,29752	0,961765	-3,42861	0,011006
Inóculo (Q)	3,22830	1,268426	2,54512	0,038376
(X ₃) Temperatura (L)	3,05168	0,961765	3,17300	0,015642
Temperatura (Q)	13,85133	1,268426	10,92009	0,000012
X ₁ X ₂	-0,71250	1,161201	-0,61359	0,558890
X ₁ X ₃	-0,68750	1,161201	-0,59206	0,572429
X ₂ X ₃	-0,38750	1,161201	-0,33371	0,748375
R ² =0,96				

$$AT_f(g/L) = 39,7914 + 2,6411x_1 + 3,2556x_1^2 - 3,2975x_2 + 3,2283x_2^2 + 3,0517x_3 + 13,8513x_3^2 - 0,7125x_1x_2 - 0,6875x_1x_3 - 0,3875x_2x_3 \quad (4.15)$$

As interações entre as variáveis não exerceram influência significativa sobre a concentração de açúcares residuais. Assim, a Tabela 4.33 indica os coeficientes de regressão significativos para o modelo, que geraram a Equação 4.16.

Tabela 4.33: Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para açúcares residuais.

Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(10)	p
Termo independente	39,79143	1,509210	26,36573	0,000000
(X ₁) Enzima (L)	2,64114	0,851495	3,10177	0,011217
Enzima (Q)	3,25556	1,122997	2,89899	0,015861
(X ₂) Inóculo (L)	-3,29752	0,851495	-3,87262	0,003096
Inóculo (Q)	3,22830	1,122997	2,87472	0,016535
(X ₃) Temperatura (L)	3,05168	0,851495	3,58390	0,004979
Temperatura (Q)	13,85133	1,122997	12,33426	0,000000
R ² =0,95				

$$AT_f(g/L) = 39,7914 + 2,6411x_1 + 3,2556x_1^2 - 3,2975x_2 + 3,2283x_2^2 + 3,0517x_3 + 13,8513x_3^2 \quad (4.16)$$

O coeficiente de regressão (R²) obtido após o ajuste foi de 0,95, que é um bom ajuste. Os resultados indicam concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, como mostra a Figura 4.31. Pela Figura 4.32 pode-se observar que os resíduos se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta.

O quadro de ANOVA representado pela Tabela 4.34 tem o valor de F_{calc} (34,35037) que é maior que o F_{tab} (3,22). Assim, o modelo obtido para a concentração de açúcares residuais é significativo.

Tabela 4.34: Análise de variância para açúcares totais no final da fermentação (AT_f).

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão	1744,003	6	290,6671	
Resíduo	84,61833	10	8,461833	34,35037
Total	1828,621	16	299,1289	
$F_{6,10;0,05} = 3,22$				

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.33 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 e X_2 para o rendimento.

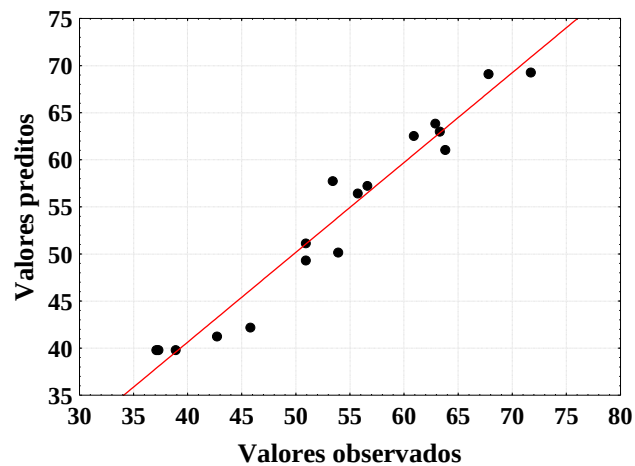


Figura 4.31: Valores observados e valores preditos para açúcares totais residuais.

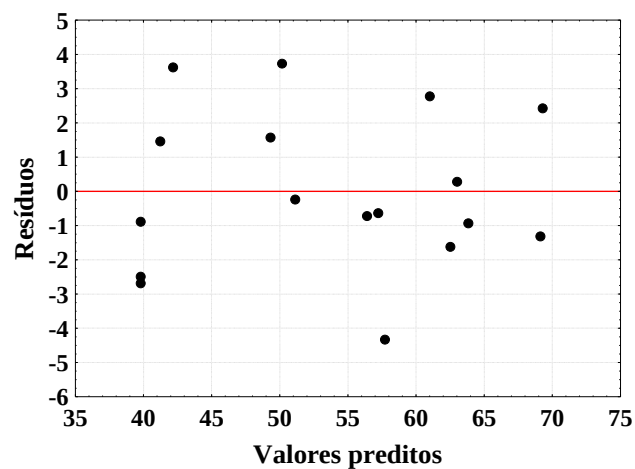


Figura 4.32: Distribuição dos resíduos para a resposta açúcares totais residuais.

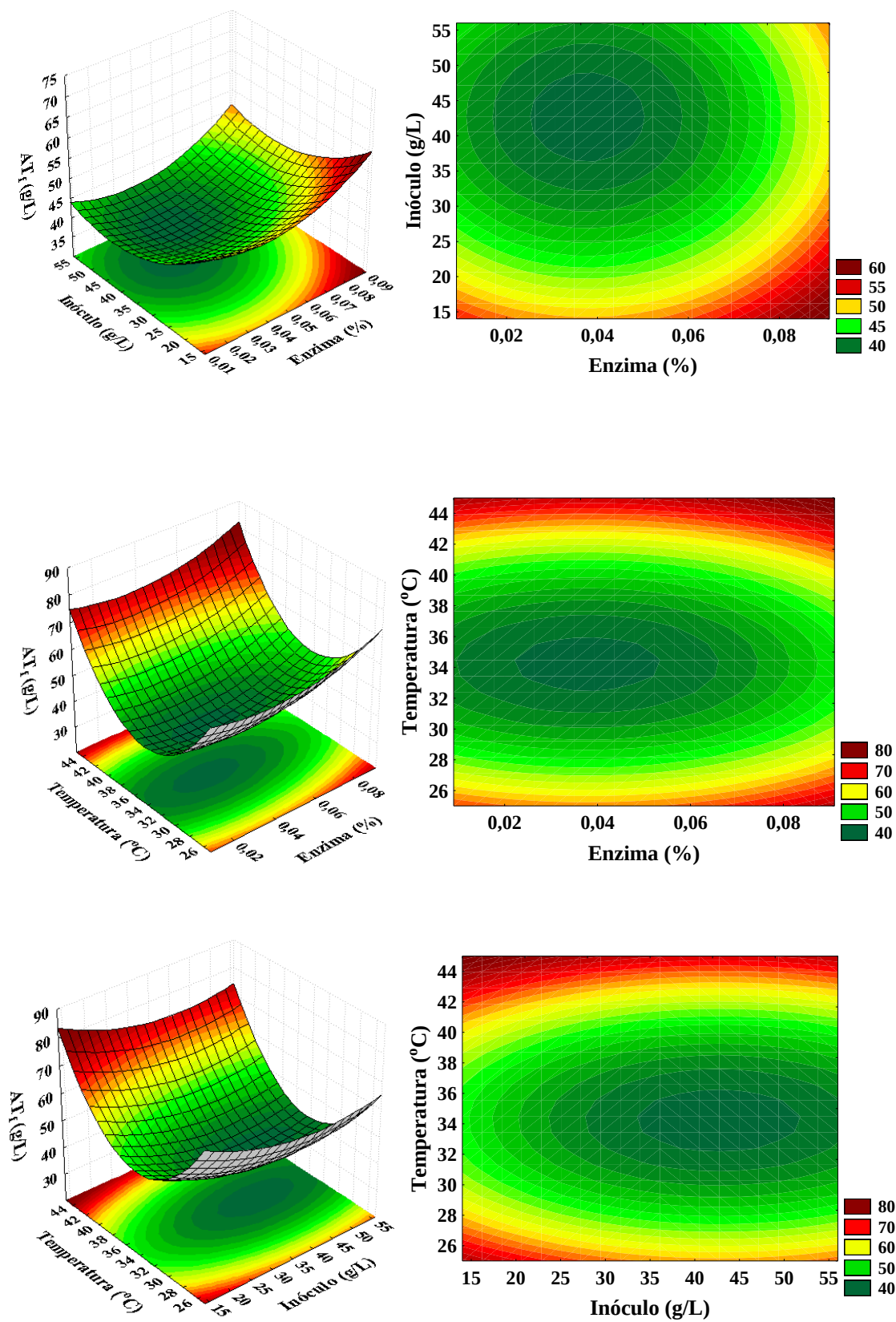


Figura 4.33: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta açúcares residuais totais.

Observa-se na Figura 4.33 que o mínimo de concentração de açúcares residuais do processo de HFS se encontra na faixa de 0,030 a 0,050% de enzima SM em relação ao peso do substrato, 35 e 50 g/L de inóculo e entre 32 e 36°C de temperatura.

Assim foi realizado um experimento nas condições de menor custo e que maximizasse as respostas rendimento Y_1 e concentração de açúcar residual. A condição selecionada foi 0,035% de enzima, 35 g/L de inóculo e 33°C. A temperatura de 33°C foi adotada visando manter as condições dentro da faixa otimizada mesmo com as flutuações experimentais. Os resultados experimentais foram 80,3% para o rendimento e 38,7 g/L de açúcar residual. Os valores das variáveis na forma codificada quando adicionadas aos modelos para o rendimento (Equação 4.14) e para o açúcar residual (Equação 4.16) foram de 80,8% e 39,7 g/L, respectivamente. Confirmando a reprodutibilidade dos resultados experimentais na região de otimização.

Comparando as duas fermentações com hidrólise separada e a simultânea, verifica-se que na hidrólise separada a produção de etanol (54,6 g/L) e o rendimento Y_2 (67,5%) foram maiores quando comparados aos valores para hidrólise e fermentação simultâneas: 49,9 g/L de etanol e rendimento Y_2 de 62,0%. O rendimento Y_1 para ambas as fermentações foi próximo, pois apesar da hidrólise e fermentação separadas terem disponibilizado concentrações de etanol bem parecidas com aquelas da hidrólise e fermentação simultâneas, as concentrações de açúcares residuais do processo simultâneo foram maiores. Este fato pode indicar que estudo mais detalhado dessa fermentação, com a otimização das variáveis empregando faixas mais estreitas das mesmas, pode melhorar o processo. Por outro lado, o processo com hidrólise simultânea, com a retirada de etanol e com a reutilização das leveduras pode aumentar a produção de etanol empregando o melaço de soja na forma mais concentrada, o que evitaria as diluições. Além disso, a fermentação simultânea pode ser realizada em menor tempo de processo e em menores temperaturas. Mas em um processo conjugado com a produção de etanol a partir de caldo de cana, onde há sobra de energia gerada pelo bagaço, a seleção do melhor processo deve também avaliar a matriz energética do mesmo.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

A partir dos resultados foi possível concluir que:

- A fermentação de melaço de soja diluído *in natura* apresentou um rendimento na produção de etanol Y_1 maximizado com concentração entre 320-400 g/L de melaço de soja e 30-45g/L de inóculo. Para minimização da concentração de açúcares residuais foi encontrada uma faixa que variou de 180-250 g/L de melaço de soja e 25-45 g/L de inóculo.
- O melaço de soja hidrolisado e fermentado em seqüência, ambos os processos em pH 4,5, tem maiores rendimentos de fermentação com relação ao consumo de açúcar nas faixas de 0,050-0,080% de enzima e temperatura de 54-56,5°C no processo de hidrólise. O mínimo de açúcares residuais da fermentação pode ser atingido utilizando uma faixa de enzima de 0,045-0,070% e temperatura de 54-57°C. O melaço de soja hidrolisado e fermentado em seqüência, com pH 5,5 para o processo de hidrólise e pH 4,5 para a fermentação, tem maiores rendimentos com relação ao consumo de açúcar nas faixas de 0,035-0,055% de enzima e temperatura de 58-60,7°C no processo de hidrólise. O mínimo de açúcares residuais da fermentação pode ser atingido utilizando uma faixa de enzima de 0,045-0,070% e temperatura de 59-60,7°C. Ambos os processos tendo, no total, duração de 14 horas.
- O pH 4,5 e a condição do ponto central (concentração de enzima de 0,050% e temperatura de 55°C) foi escolhido como melhor processo de produção de hidrólise enzimática em separado.
- Para hidrólise e fermentação simultâneas, com 12 horas de processo foi possível alcançar maiores rendimentos com 0,030-0,060% de enzima, 35-55 g/L de inóculo e 32-36°C de temperatura. A faixa que minimizou a

concentração de açúcares residuais ficou entre 0,030-0,050% de enzima, 35-50 g/L de inóculo e 32-36°C de temperatura.

- A hidrólise enzimática aumentou o rendimento da produção de etanol a partir do melaço de soja.
- O melaço de soja se mostrou um substrato potencial para produção de etanol com levedura *Saccharomyces cerevisiae* em bioreator batelada nos três processos estudados: fermentação do melaço *in natura*, hidrólise enzimática e posterior fermentação e hidrólise e fermentação simultâneas.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Reciclo de substrato aproveitando açúcares residuais, visando reduzir a diluição do melaço de soja e obter altos rendimentos em relação ao substrato consumido;
- Fermentação fazendo reciclo das leveduras;
- Imobilização de enzimas para a hidrólise do melaço de soja;
- Fermentação alcoólica com outras linhagens de levedura;
- Fermentação alcoólica do melaço de soja em outros tipos de reatores;
- Avaliar a fermentação conjunta de melaço de soja e de cana de açúcar.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.441-448, 2001.

ALCOOLBRÁS, 2006. Revista Alcoolbrás. Edição nº 101. Abril 2006.

AMORIM, H. V. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba. São Paulo, 2005. Fermentec, 448p.

ARAÚJO, E. H. Redução na poluição dos laticínios pela transformação da lactose do soro de queijo em etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENSINO DE ENGENHARIA. Porto Alegre, 2001. **Anais: COBENGE 2001**.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, 26, p. 89-105, 2008.

BARGA, M. C., **Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido**. Dissertação-Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

BNDES SETORIAL. **O ciclo da soja: Desempenho da cultura da soja entre 1961 e 2000**. Rio de Janeiro, n.20, p 127-222, 2004.

BNDES. Banco Nacional do Desenvolvimento. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 316 p. Rio de Janeiro, 2008.

BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. Carboidratos. In: **Introdução à Química de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. p.46.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, T. S. **Statistics for Experimenters**. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc., 1978.

BRINGHENTI, L, *et al.* Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melão de cana. **Ciências agrotécnicas**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro, E-papers serviços editoriais, 2003.

CALLEGARI, C.M. **Hidrólise de Oligossacarídeos de Rafinose presentes em produtos de soja, por α -galactosidases**. 2003. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CAZETTA, M. L. *et al.* Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, Londrina, v. 98, p.2824-2828, 8 abr. 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Apresenta dados sobre Levantamento de grãos. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 16 Jun. 2011.

CHO, D. H. *et al.* Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, Coréia, v. 102, p.4439-4443, 2011.

DAVIS, L. *et al.* Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. **Biomass And Bioenergy**, Austrália, v. 30, p.809-814, 8 maio 2006.

DHALIWAL, S. S. *et al.* Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, Índia, v. 102, p.5968-5975, 2011.

DIAS, C.. **Cartilha do Etanol**. Ed. Globo. Encomendado pela UNICA. Disponível em: < www.etanolverde.com.br >. Acesso em: 1 mar. 2011.

DONG, M. W. Introduction. In: DONG, M. W. **Modern HPLC for practicing scientists**. Estados Unidos: Wiley-interscience, 2006. p. 1-12.

DORTA, C. OLIVA-NETO, P. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** , vol. 22, p. 177-182, 2006.

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production**. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Apresenta texto sobre a Soja no Brasil. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 15 abr. 2010.

ERICKSON, D. R. Composition of soybeans and soybeans products. In: **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Ed. ERICKSON, D. R. American Soybean Association, St. Louis, Missouri and American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, 1995.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H.. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p.361-380, jun. 2009.

FALKOSKI, D.L. **Purificação e caracterização de α -galactosidases do fungo *Penicillium griseoroseum* para utilização na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em derivados de soja**. 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FIALHO, L. S. **Purificação e caracterização de uma α -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* e clonagem parcial do gene da estaquiose sintase de soja**. 2007. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GÓES, S. P.; RIBEIRO, M. L. L. α -galactosidase: aspectos gerais e sua aplicação em produtos a base de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23, n.1, p.111-119, 2002.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L.. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, Portugal, v. 28, n. , p.375-384, 4 fev. 2010.

INGLEDEW, W. M. **Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook**. 3 edição. UK: Nottingham University Press; 1999.

IMCOPA. Apresenta texto sobre a Soja. Disponível em <<http://www.imcopa.com.br/index.php>>. Acesso em: 03 jan. 2011.

KÁDAR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops And Products**, Hungria, v. 20, p.103-110, 22 dez. 2003.

KANNAN, T. R.; SANGILIYAND, G.; GUNASEKARAN, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrase in immobilized cell fermentation. **Enzyme And Microbial Technonogy**, India, v. 22, p.179-181, 1998.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J.. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme And Microbial Technology**, Suécia, v. 40, p.138-144, 2006.

KIM, W.D. et al. Purification and characterization of α -galactosidase from sunflower seeds. **Biotechnology Letters**, v.25, n.4, 353-358, 2003.

KRISHNA, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, India, v. 77, p.193-196, 2001.

LeBLANC, J.G. et al. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase, **Genet Mol. Res.**, Argentina, v.3, n.3, p. 432-40, 2004.

LEITE, R. C. de C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Revista Novos Estudos**, v.78, p.15-21, 2007.

LETTI, L. A. J. **Production of bioethanol by soybean molasses fermentation by *Zymomonas mobilis***. 2007. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LIMA, E. E.; et al. Caracterização de alfa-galactosidase em embrião e cotilédones de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli, var. pubescens (tamboril-da-mata). **Rev. bras. sementes**, v.26, n.2, p. 82-90, 2004.

LIMA, U.A. BASSO, L.C. AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Edgard Blücher, v.3, 2001. p.1 – 43.

MACHADO, R. P. **Produção de etanol a partir do melaço de soja**. 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MANZANARES, P.; GRAFF, L.H.; VISSER, J. Characterization of Galactosidases from *Aspergillus niger*: Purification of a Novel α -Galactosidase Activity. **Enzyme and Microbial Technology**, Países Baixos, v.22, n.5, p.383-390, 1998.

MUSSATO, S.I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, Brasil, n. 68, p.587-597, 2007.

NEVES, L.C.M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando 'Saccharomyces cerevisiae' W303-181**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

NIGAM, J. N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. **Journal of Biotechnology**, India, p. 189-193. mar. 2000a.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicelluloses hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, India, p. 17-27.11. nov. 2000b.

NIKOLIC, S. et al. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Fuel**, Sérvia, v. 88, p.1602-1607, 12 jan. 2009.

ÖHGREN, K. et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal Of Biotechnology**, Suécia, v. 126, p.488-498, 4 maio 2006.

OLOFSSON, K.; RUDOLF, A.; LÍDEN, G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Biotechnology**, Suécia, v. 134, p.112-120, 8 jan. 2008.

OSTROWSKI, A. P. et al. Obtenção de álcool etílico a partir de amido de mandioca. In: Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar, 1.; 2006, Camboriú. Anais: MICTI 2006.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

PALLARDY, S. G. Carbohydrates: Kinds of Carbohydrates. In: PALLARDY, S. G.; KOZLOWSKI, T. T. **Physiology of Wood Plants**. Estados Unidos: Elsevier, 1997. p. 199-204.

PORTER, J. E. et al. Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean α -galactosidase. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v.14, p.609-613, 1992.

ROSA, A. M. et al. Alimentos fermentados à base de soja (*Glycine max* (Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.7, n.4, p.454-462, out/dez 2009.

REIS, H. B.; RIBEIRO, E. J. Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito em fermentação alcoólica de mostos de sacarose. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13, 2009, Uberlândia. **ISSN 21771731**.

RFA. Renewable Fuels Association, Washington. Statistics. Disponível em < <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics#E> >. Acesso em: 20 ago. 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª.Ed. Campinas-SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROY, S. et al. Optimal control strategies for simultaneous saccharification and fermentation of starch. **Process Biochemistry**, India, v. 36, p.713-722, 7 nov. 2000.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A.. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. **Enzyme And Microbial Technology**, Estados Unidos, v. 41, p.528-532, 2007.

SALIK, F. L. M.; POVH, N. P. Método eletrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: **Congresso Nacional da Stab**, 5, Águas de São Pedro, 1993. Anais, p.262-263, Piracicaba.

SANADA, C.T.N. et al. Utilization of soybean vinasse for α -galactosidase production. **Food Research International**, Curitiba, v. 42. p. 476–483, 2009.

SÁNCHEZ, O J; A CARDONA, C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Colombia, n. 99, p.5270-5295, 26 dez. 2007.

SANTOS, A. M. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas.

SANTOS, J. R. A. et al. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, Recife, v. 33, n. 4, p.904-908, 10 mar. 2010.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) –Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G.. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. **Enzyme And Microbial Technology**, Suécia, v. 39, p.756-762, 20 dez. 2005.

SCIGELOVA, M.; CROUT, D. H. G. Purification of α -galactosidase from *Aspergillus niger* for application in the synthesis of complex oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Reino Unido, v.8, n.4-6, p.175-181, 2000.

SHABALIN, K. A. et al. Enzymatic properties of α -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides. **Enzyme And Microbial Techonolgy**, Rússia, n. 30, p.231-239, 22 out. 2001.

SHINOZAKI, Y.; KITAMOTO, H. K.. Ethanol production from ensiled rice straw and whole-crop silage by the simultaneous enzymatic saccharification and fermentation process. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, Japão, v. 111, n. 3, p.320-325, 2011.

SILVA, G. A. **Purificação parcial e caracterização de uma alfa-galactosidase de sementes de guapuruvu (*Schizolobium parahyba*)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade Federal de Brasília, Brasília.

SIQUEIRA, P. F. **Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SOUZA, K.M., et al. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica Unicamp**, 6, 2005, Campinas. Anais eletrônicos... Campinas:Unicamp, 2005. Disponível em: <<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/tBT55.pdf>> Acesso em: 23 fev. 2010.

SRICHUWONG, S. et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass And Bioenergy**, Japão, v. 33, p.890-898, 10 mar. 2009.

SRIPUAN, T.; AOKI, et al. Purification and characterization of thermostable alpha-galactosidase from *Ganoderma lucidum*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.67, n.7, p.1485-1491, jul. 2003.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

THIPPESWAMY, S.; MULIMANI. V.H. Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. **Process Biochemistry**, Índia, n. 38, p.635-640, 4 dez. 2001.

UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar. Estatísticas – Produção de etanol no Brasil. Disponível em <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>>. Acesso em 20 jul. 2010.

VIANA, P. A. et al. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases. **Food Chemistry**, Viçosa, n. 103, p.331-337, 2007.

YAMAGUISHI, C.T. **Processo biotecnológico para a obtenção de caldo de feijão em pó**. 2007. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

ZHAO, Y., X. et al. Extraction and salting-out purification of α -galactosidase and β -glucosidase from fresh roots of *Rehmannia glutinosa*. **Zhong Yao Cai**, v.29, n.2, p.137-139, fev. 2006.

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal Of Biotechnology**, China, v. 144, p.23-30, 6 maio 2009.

ANEXO 1:

FICHA INFORMATIVA DA ENZIMA STARMAX AGSL



StarMax® AGSL

StarMax® AGSL é um produto constituído a base de **alfa-galactosidase**, produzida por uma fermentação controlada de *Aspergillus niger*.

E.C. 3.2.1.22

procurar o nome E.C.

APLICACÃO

Esta enzima hidrolisa as ligações de alfa-1,6-glicosídicas em oligossacarídeos (alfa-galactosídeos), liberando açúcares como galactose, glucose, frutose e sacarose.

O pH ótimo é de 4,5 à 5,5 e a temperatura ótima de atuação é de 55°C à 60°C.

A dosagem ótima de StarMax® AGSL no processo depende de parâmetros, como tipo de matéria prima (quantidade de amido no produto), tempo de processamento, pH, temperatura e quantidade de substância seca.

A dosagem inicial recomendada é de 0,025 à 0,05% baseado no peso do substrato.

BENEFÍCIOS

- Hidrólise eficiente de rafinose, estaquiose, verbascose e alfa-galactosídeos relacionados em componentes digeríveis como galactose, glucose, frutose e sacarose.
- Em fabricação de açúcar de beterraba, hidrolisa a rafinose, facilitando a cristalização do açúcar e aumentando o rendimento do processo.
- Em produtos para digestão, melhora a eficiência da digestão de oligossacarídeos.

CARACTERÍSTICAS

StarMax® AGSL é um líquido de cor amarronzada.

EMBALAGSLEM

StarMax® AGSL está disponível em bombonas de 25kg, feitas em polietileno.

ESTOCAGSLEM

StarMax® AGSL deve ser estocada em um local seco, arejado e na sua embalagem fechada. Sua validade pode ser estendida se o produto for estocado sob refrigeração.

CUIDADOS NO MANUSEIO

A inalação da enzima deve ser evitada. Em caso de contato com a face e olhos deve-se lavar rapidamente com água corrente durante 15 minutos.

Prozyn Ind. e Com. Ltda.

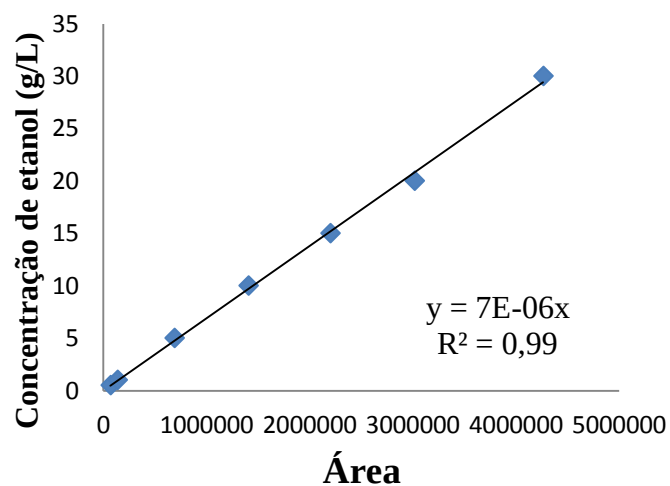
Rua Dr. Paulo Leite de Oliveira, 199 - Butantã - CEP 05551-020 - São Paulo/SP - Brasil

Tel.: 55 11 2722 0000 / 2725 2000 - Fax: 55 11 2722 0021 - www.prozyn.com

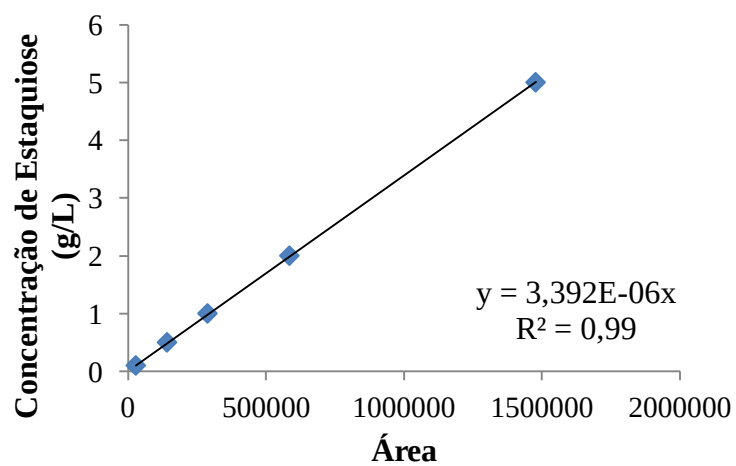
ANEXO 2:

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

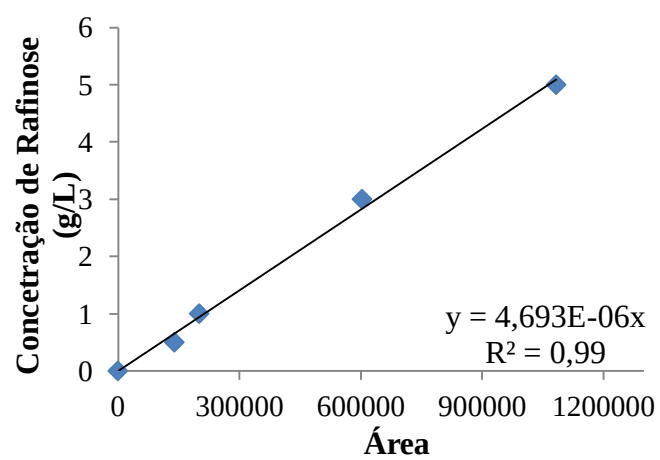
Curva de calibração para concentração de etanol



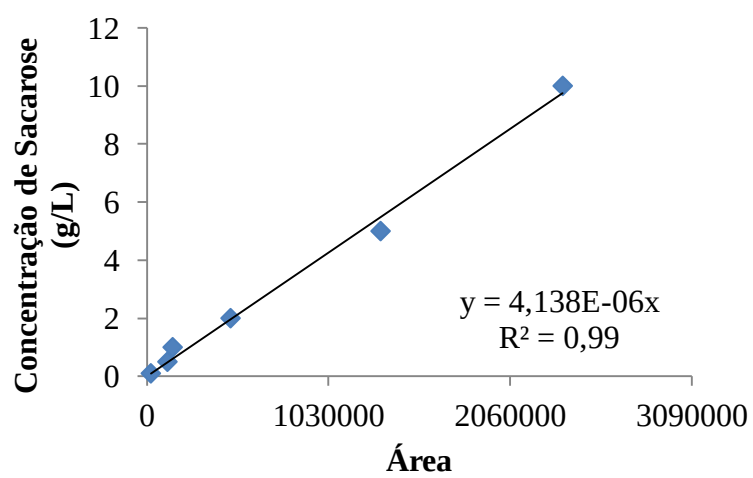
Curva de calibração para concentração de estaquiose



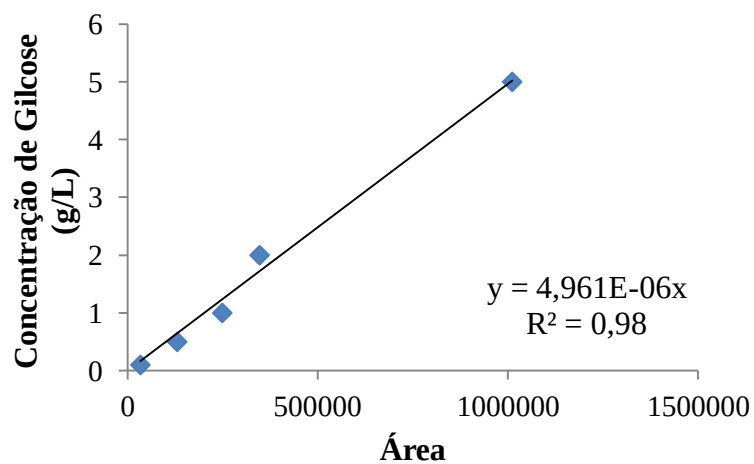
Curva de calibração para concentração de rafinose



Curva de calibração para concentração de sacarose



Curva de calibração para concentração de glicose



Curva de calibração para concentração de frutose

