UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DO AMIDO DE BATATA (*Solanum Tuberosaum L.*) UTILIZANDO ENZIMAS AMILOLÍTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gustavo Callegari Scipioni

Santa Maria, RS, Brasil
2011

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Carlos (*in memorium*) pela orientação na vida, e acreditar mais que eu na realização deste trabalho desde seu início e a minha mãe Alda pela oportunidade da vida e amor incondicional, obrigado por tudo. Aos meus irmãos e a todos os nossos familiares que, de certa forma, colaboraram com a realização deste trabalho.

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DO AMIDO DE BATATA (*Solanum Tuberosaum L.*) UTILIZANDO ENZIMAS AMILOLÍTICAS

por

Gustavo Callegari Scipioni

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Lisiane de Marsillac Terra

Santa Maria, RS, Brasil
2011

S418o

Scipioni, Gustavo Callegari
Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (Solanum Tuberosaum L.) utilizando enzimas amilolíticas / por Gustavo Callegari Scipioni. - 2011.
95 p. : il. ; 31 cm
Orientadora: Lisiane de Marsillac Terra.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, RS, 2011

1. Engenharia de processos 2. Agroindústria 3. Cultura da batata 4. Processo de hidrólise 5. Sacarificação 6. Otimização 7. Função desejabilidade 8. Amilase 9. Amiloglicosidase I. Terra, Lisiane de Marsillac II. Título.
CDU 631
633.491
635.21

Ficha catalográfica elaborada por Simone G. Maisonave - CRB 10/1733
Biblioteca Central da UFSM

©2011
Todos os direitos autorais reservados a Gustavo Callegari Scipioni. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
Endereço: Rua Iguaçu, Nº 476, Sala 605, Centro, Pato Branco, PR, Brasil, CEP: 85501-270;
Fone: (0xy) 46 32242965; FAX: (0xy) 46 32242965;
Endereço Eletrônico: scipioni@creapr.org.br

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DO AMIDO DE BATATA (*Solanum Tuberosaum L.*) UTILIZANDO ENZIMAS AMILOLÍTICAS

elaborado por
Gustavo Callegari Scipioni

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lisiane de Marsillac Terra, Dr.ª
(Presidente/Orientadora)

Marlene Terezinha Lovatto, Dr.ª (UFSM)
(Examinadora)

Paula Rossini Augusti, Dr.ª (Unipampa)
(Examinadora)

Santa Maria, 20 de maio de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de evoluir.

À Professora Lisiane Terra pela orientação, estímulo e confiança.

As Professoras Marlene Lovatto e Paula Rossini pela colaboração na participação da banca examinadora.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos que o mestrado me possibilitou de conhecer, pela amizade e colaboração em especial aos colegas Rafael Zini e Renata Colares pelas parcerias que muito ajudaram neste trabalho e na convivência do dia-a-dia.

Aos laboratoristas Alfeu, Helena e Gustavo, e ao grande parceiro Leonardo pelas inúmeras conversas e auxílio nestes anos. Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) – da UFRGS, especialmente ao Sr. Roberval pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus de Pato Branco, os professores Idemir Citadin e José Abramo e de modo especial ao biólogo Douglas Alamino, pela contribuição durante a realização das análises deste trabalho.

As meninas do Laboratório de Toxicologia, pela simpatia durante o estágio e em especial a Bárbara Clasen pela paciência e disposição e para a Prof.ª Vânia pela oportunidade.

Às bolsistas, Luiza, Jocieli e a Rúbia pela atenção e contribuição na realização dos experimentos iniciais e todas as pessoas que contribuíram de forma direta e indireta neste trabalho.

A empresa Prozyns pela doação das enzimas, que possibilitou a realização deste trabalho.

A Capes pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DO AMIDO DE BATATA (*Solanum Tuberosaum L.*) UTILIZANDO ENZIMAS AMILOLÍTICAS

AUTOR: GUSTAVO CALLEGARI SCIPIONI
ORIENTADORA: LISIANE DE MARSILLAC TERRA
Data e Local da Defesa: 04 de julho de 2011, Santa Maria.

A batata (*Solanum tuberosum*) é importante matéria-prima agroindustrial para produção de hidrolisados. A falta de informações sobre o processo de hidrólise do amido de batata na indústria dificulta a utilização desta matéria-prima regional e favorece o uso das culturas como: milho, mandioca e cana de açúcar para produção de álcool etílico. O objetivo deste trabalho foi apurar a faixa otimizada dos efeitos de diferentes concentrações de substrato, concentração de enzima amiloglicosidase (AMG) e períodos reacionais, na redução de tempo do processo, enzimas e material a ser hidrolisado. Foi realizado um desenho experimental central composto, com três variáveis independentes sendo elas: [1] concentração de substrato (3-7%), [2] dosagem enzimática (0,36-1,0µL/g de MS), [3] tempo de ação das enzimas computado após a adição da AMG no meio (4 a 48 horas). A concentração de α-amilase manteve-se constante em 0,8µL/g de amido. Os experimentos foram conduzidos em bioreator seguido de banho metabólico. As variáveis dependentes analisadas foram a concentração de açúcares redutores (AR) e a eficiência de hidrólise do amido. Os dados foram tratados pelo *Statistica* 8.0, para gerar modelos preditivos a 95% de confiança. O teor maior de AR foi alcançado no meio (35,55g/L), com tempo (26 horas) e dosagem de enzima (0,68µL) e concentração de substrato no nível máximo (7%). A maior eficiência de hidrólise (125%) ocorreu com a razão mínima de substrato (3%) e dosagem de enzimas (0,68µL) e tempo no nível médio (26 horas). Para a redução dos custos com enzima (0,36µL/g MS de AMG), trabalhando-se com a mesma concentração de substrato, o modelo estimou que a hidrólise por 39 horas era capaz de liberar 33,17 g/L de AR , com 128,62% de eficiência. O uso de diferentes concentrações de enzimas não apresentou incremento significativo nas respostas, sendo que o fator tempo se estabeleceu abaixo do recomendado pelo fabricante das enzimas. A concentração de substrato influenciou de forma mais significativa que os demais fatores, para ambas variáveis dependentes. O rendimento apresentado demonstra que este processo é uma alternativa eficiente à indústria, despontando este material como fonte importante para produção de hidrolisados.

Palavras-chave: batata, sacarificação, otimização, função desejabilidade, amilase, amiloglicosidase

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Graduate Program in Process Engineering
Federal Universidade de Santa Maria

OPTIMIZATION OF THE SACCHARIFICATION OF POTATO STARCH (*Solanum Tuberosaum L.*) USING AMYLOLYTIC ENZYMES
AUTHOR: GUSTAVO CALLEGARI SCIPIONI
ADVISER: LISIANE DE MARSILLAC TERRA
Defense Place and Date: Santa Maria, July 04nd, 2011.

The potato (*Solanum tuberosum*) is important raw material for agro-industrial production of hydrolysates. The lack of information about the process of hydrolysis of potato starch industry hampers the use of regional raw material and promote the use of crops such as maize, cassava and sugarcane to produce ethanol. The objective of this study was to determine the optimum range of the effects of different concentrations of substrate, concentration of enzyme amyloglucosidase (AMG) and reaction times, reduce process time, enzymes and material to be hydrolyzed. This was a central composite experimental design with three independent variables namely: [1] substrate concentration (3-7%) [2] enzyme dosage (0.36 to 1.0 μL.g MS^{-1}) [3] time of action of enzymes computed after the addition of AMG in the middle (4 to 48 hours). The α-amylase concentration remained constant at 0.8 μL/g starch. The experiments were conducted in the bioreactor followed by metabolic bath. The dependent variables analyzed were the concentration of reducing sugars (RS) and the efficiency of hydrolysis of starch. The data were processed by Statistica 8.0, to generate predictive models at 95% confidence. The larger fraction of RA was reached in the middle (35.55 g/L), with time (26 hours) and dose of enzyme (0.68 mL) and substrate concentration at the maximum level (7%). The efficiency of hydrolysis (125%) occurred with the minimum ratio of substrate (3%) and enzyme dosage (0.68 mL) and the average time (26 hours). To reduce costs of enzyme (0.36 mL AMG), working with the same concentration of substrate, the model estimated that the hydrolysis for 39 hours was able to release 33.17 g/L of the AR 128, 62% efficiency. The use of different enzyme concentrations showed no significant increase in responses, and the time factor is set lower than recommended by the manufacturer of the enzymes. The concentration of substrate influenced more significantly than other factors, for both dependent variables. The performance presented demonstrates that this process is an efficient alternative to the industry, emerging as an important source this material for the production of hydrolysates.

Keywords: potato, saccharification, optimization, desirability function, amylase, amyloglucosidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conteúdo nutricional da batata em 100g, após cozimento e descasque para consumo 19
Figura 2 - Fluxograma da produção industrial de flocos dessecados de batata 20
Figura 3 - Estrutura dos componentes da molécula de amido 24
Figura 4 - Estrutura da amilose. 25
Figura 5 - Estrutura da amilopectina. 26
Figura 6 - Amido de batata 28
Figura 7 - Grânulos de batata 28
Figura 8 - Hidrólise enzimática do amido pelas enzimas amilolíticas 30
Figura 9 - Processo pré-fermentativo de amiláceos (2 vias alternativas) 34
Figura 10 - Fluxograma do processo de hidrólise enzimática de substrato amiláceo 35
Figura 11 - Fluxograma das hidrólises ácida e enzimática do amido 36
Figura 12 - Rota de ação da amilase sobre amido 38
Figura 13 - Processo de cozimento contínuo e liquefação enzimática em um estágio do amido 39
Figura 14 - Rota de ação da amiloglicosidase sobre carboidratos 40
Figura 15 - Modelo tridimensional do Delineamento composto rotacional (DCCR) 43
Figura 16 - Modelo pictórico de 15 pontos de um DCCR 43
Figura 17 - Etapas do processo de hidrólise do amido empregado no processo experimental 52
Figura 18 - Bioreator utilizado na fase experimental de liquefação do amido 54
Figura 19 - Ensaios na fase de sacarificação em banho metabólico 55
Figura 20 - Foto dos flocos de batata dessecados após moagem 62
Figura 21 - Gráfico dos valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta Y1 66
Figura 22 - Diagrama de Pareto para a resposta Y1 66
Figura 23 - Superfície de resposta para a Y1 (g/L) em função de E (µL) versus S(%) 67
Figura 24 - Curva de contorno para resposta a Y1 (g/L) em função de E (µL) versus S(%) 67
Figura 25 - Superfície de resposta para a Y1 (g/L) em função de E (%)versus t(h) 68
Figura 26 - Curva de contorno para resposta a Y1 (g/L) em função de de E (%)versus t(h) 68
Figura 27 - Superfície de resposta para a resposta Y1 (g/L) em função de S(%) versus t(h) 69

Figura 28 - Curva de contorno para a resposta Y1 em função de S(%) versus t(h) 69
Figura 29 - Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta Y2 71
Figura 30 - Diagrama de Pareto para a resposta Y2 71
Figura 31 - Superfície de resposta para a resposta Y2 (%) em função de S(%) versus E(µL) 72
Figura 32 - Curva de contorno para a resposta Y2 (%) em função de S(%) versus E(µL) 72
Figura 33 - Superfície de resposta para a resposta Y2 (%) em função de E(µL) versus t(h) .. 73
Figura 34 - Curva de contorno para a resposta Y2 (%) em em função de E(µL) versus t(h).. 73
Figura 35 - Superfície de resposta para a resposta Y2 (%) em função de S(%) versus t(h).... 74
Figura 36 - Curva de contorno para a resposta Y2 (%)em função de S(%) versus t(h) 74
Figura 37 - Perfis dos valores preditos e Desejabilidade para as respostas Y1 e Y2 respectivamente 79
Figura 38 - Gráfico do tempo versus liberação de AR (Ensaios > de 13 horas) 81
Figura 39 - Gráfico do tempo versus liberação de AR (Ensaios < 39 horas) 81
Figura 40 - Gráfico de tempo versus liberação de AR (Ensaios de 26 horas) 82
Figura 41 - Gráfico de tempo versus liberação de AR (Ensaios de 26 horas) 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de amidos naturais 23
Tabela 2 - Teor de amilose % do amido (BS) de plantas amiláceas, usando dois padrões comerciais. 25
Tabela 3 - Classificação internacional das enzimas 29
Tabela 4 - Nomenclatura de enzimas importantes no processamento do amido 31
Tabela 5 - Temperaturas de gelatinização de amidos de diferentes fontes botânicas 37
Tabela 6 - Aplicabilidade dos processos de cozimento e liquefação do amido a diferentes matérias primas 39
Tabela 7 - Diferentes matérias-primas para a produção de bioetanol e seus comparativos de potencial de produção 42
Tabela 8 - Valores escalonados dos diferentes graus de desejabilidade de d ou D 45
Tabela 9 - Características dos concentrados enzimáticos 49
Tabela 10 - Valores utilizados no DCCR para três fatores 49
Tabela 11 - Valores codificados e reais do DCCR para a combinação dos fatores: concentrações de enzima, a percentagem de sólidos e o tempo de reação 51
Tabela 12 - Plano de amostragem para a variável X_3 ou (t) 56
Tabela 13 - Composição físico-química do substrato de batata 59
Tabela 14 - Comparação da composição química da amostra de flocos de batata dessecados com produtos comerciais 59
Tabela 15 - Distribuição granulométrica da amostra 61
Tabela 16 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 com as respostas Y1 e Y2 63
Tabela 17 - Análise de variância do modelo ajustado para a resposta açucares redutores 65
Tabela 18 - Análise de variância do modelo ajustado para a resposta eficiência de hidrólise 70
Tabela 19 - Parâmetros utilizados na otimização das respostas do processo de hidrólise 77
Tabela 20 - Respostas previstas para cada nível de cada fator mantendo todos os outros fatores constantes em sua configuração atual 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.A	Alfa-Amilase
AMG	Amiloglicosidase
A.O.A.C.	Association of Official Agricultural Chemist
AI	Amostra integral
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPQ	Conselho Nacional de Pesquisa
d	Desejabilidade
D	Desejabilidade
DCCR	Delineamento composto rotacional
DOE	Experimental Design (Industrial)
E	Variável X1 – Dosagem enzimática de amiloglicosidase (µL)
IAL	Instituto Adolf Lutz
IUMBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
LI	Limite inferior
LM	Limite médio
LS	Limite superior
MDT	Estrutura para apresentação de Monografia, Dissertação e Tese da UFSM
MS	Massa seca
MRS	Metodologia de superfície de resposta
S	Variável X2 – Porcentagem de substrato no meio reacional
SBRT	Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas
SR	Superfície de resposta
SSF	Sacarificação simultânea a fermentação
T	Variável X3 – Tempo de permanência da enzima no meio (horas)
UNIPAMPA	Universidade Federal do Pampa
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UTFPR	Universidade Tecnológica do Paraná
Y1	Resposta 1 (açucares redutores)
Y2	Resposta 2 (eficiência de hidrólise)

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Roteiro completo de hidrólise-sacarificação do substrato de batata moída dessecada com uso de enzimas amilolíticas 95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1. Objetivos gerais 17
1.1.1. Objetivos específicos 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1. Cultura da batata (*Solanum tuberosum*) 18
2.2. Características nutricionais 18
2.3. Processamento da batata 19
2.3.1. Processo de produção dos flocos de batata 20
2.4. Amido 21
2.4.1. Amido na batata 22
2.5. Componentes do amido 23
2.5.1. Composição química 23
2.5.2. Amilose 24
2.5.3. Amilopectina 26
2.5.4. Estrutura granular 27
2.6. Enzimas 28
2.6.1. Nomenclatura de enzimas 29
2.7. Enzimas amilolíticas 29
2.7.1. Alfa-amilase 31
2.7.2. Amiloglicosidase 32
2.8. Processos biotecnológicos do amido 32
2.8.1. Biodegradação do amido 32
2.8.2. Hidrólise de amido 33
2.9. Hidrólise enzimática do amido 34
2.9.1. Pré-hidrólise e gelatinização 36
2.9.2. Liquefação ou dextrinização 38
2.9.3. Sacarificação 40
2.10. Uso do álcool 41
2.11. Planejamento fatorial de experimentos e otimização de processos 42
2.11.1. Metodologia de superfície de resposta 43
2.11.2. Otimização de Processos: Função Desejabilidade 44
3 MATERIAL E MÉTODOS 46
3.1. Materiais 46
3.2. Preparo da matéria-prima 46
3.3. Métodos 46
3.3.1. Análises físico-químicas no substrato 46
3.3.2. Análise granulométrica 47
3.3.3. Composição centesimal 47
3.4. Açúcares redutores totais 48
3.5. Amido 48
3.6. Enzimas 48
3.7. Planejamento experimental 49
3.8. Analises estatísticas 52
3.9. Procedimentos 52
3.9.1. Gelatinização e liquefação 53
3.9.2. Sacarificação 54
3.10. Amostragem 55

3.11. Análises dos hidrolisados 56
3.11.1. Açúcares redutores 57
3.11.2. Rendimentos e eficiências das hidrólises 57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
4.1. Preparo da matéria-prima 58
4.2. Análises do substrato de batata 58
4.3. Perfis dos ensaios experimentais 62
4.3.1. Rendimentos de AR e eficiências das hidrólises 62
4.3.2. Avaliação das variáveis dependentes do desenho experimental 63
4.4. Concentração de Açúcares redutores livres 65
4.5. Eficiência de hidrólise 70
4.6. Efeitos dos fatores (enzima, substrato e tempo) sobre as respostas 75
4.6.1. Efeitos do fator enzima sobre a hidrólise enzimática 75
4.6.2. Efeito do fator substrato sobre a hidrólise enzimática 76
4.6.3. Efeito do fator tempo sobre a hidrólise enzimática 76
4.7. Otimização das variáveis independentes pela função desejabilidade 77
4.8. Efeito da duração da etapa de sacarificação 80
5 CONCLUSÃO 83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86
ANEXO 94
Anexo A 95

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum*) na atualidade ocupa lugar de destaque como fonte alimentar, principalmente nos países em desenvolvimento. É a quarta cultura na ordem de importância no mundo, depois do trigo, do arroz e do milho. A importância da batata como um dos principais alimentos básicos do mundo sendo cada vez mais reconhecida, pois produz mais matéria seca (MS) e proteína por hectare do que as principais culturas de cereais (BURTON, 1989).

Amido pode ser hidrolisado por enzimas amilolíticas como a α-amilase. Por exemplo, quando a fécula de batata é o substrato, a sua hidrólise produz misturas de diferentes sacarídeos, maltodextrinas, ou seja, suas composições precisas são de interesse comercial considerável (ABSAR *et al*., 2009). Os produtos hidrolisados são amplamente utilizados em: alimentos, indústrias de papel e têxteis e na atualidade na produção de bicombustíveis. Frente a este fato as pesquisas em torno de novas matérias-primas amiláceas têm se intensificado nos últimos anos. Neste ponto, os países situados em regiões tropicais, como o Brasil, apresentam grande vantagem em relação aos principais produtores de amido do mundo, que estão localizados em regiões temperadas, devido à variedade de culturas tropicais.

Na literatura especializada encontram-se muitos trabalhos que utilizam diferentes condições de processos, o que torna difícil a comparação entre eles e uma escolha de um processo ótimo. Nos ensaios executados foram empregadas as enzimas α-amilase e amiloglicosidase. A concentração da α-amilase foi definida e fixada em 0,8μL/g de amido e, no estudo em questão, a concentração de amiloglicosidase, substrato e tempo variaram conforme o planejamento experimental estabelecido, de forma a abranger os intervalos citados por outros autores.

Os ensaios foram realizados em laboratório utilizando bioreator em escala piloto avaliando os efeitos da liberação de glicose no meio pela catálise enzimática em relação sobre a eficiência que o processo químico se desenvolveu frente aos parâmetros estipulados.

Assim torna-se importante estudos para otimizar processos de hidrólise.

1.1. Objetivos gerais

Com as perspectivas de se obter mais informações quanto à produção de hidrolisados enzimáticos a partir de fontes amiláceas tuberosas e resíduos agroindustriais, este estudo avaliará as condições para melhor técnica de hidrólise e sacarificação e o perfil bromatológico do amido de batata inglesa e estabelecer modelos preditivos.

1.1.1. Objetivos específicos

- Utilizar substrato de batata dessecada para a obtenção de açúcares fermentescíveis, por rota enzimática, analisando o efeito combinado de diferentes tratamentos;
- Construção de modelos preditivos para concentração de açúcares redutores e eficiência de hidrólise, tendo como variáveis independentes: concentração de substrato, dosagem enzimática de amiloglicosidase e tempo reacional;
- Reproduzir a hidrólise em laboratório, com os parâmetros prévios, e estabelecer faixas otimizadas para a realização do mesmo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura da batata (*Solanum tuberosum*)

A batata (*Solanum tuberosum*) é um tubérculo de origem andina, sendo a quarta mais importante cultura de alimentos do mundo depois do trigo, milho e arroz. Apresenta uma produção mundial de 300 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 20 milhões de hectares em mais de 125 países, sendo os grandes produtores a China, Rússia, Índia, Estados Unidos, Polônia e Ucrânia, ocupando o Brasil a 20ª posição. No ano de 2004 foram produzidas 2,8 milhões de toneladas de batata em 135,5 mil hectares no Brasil. O desempenho da produção nacional de batata nos últimos 10 anos estabilizou-se ao redor de 2,8 milhões de toneladas, mesmo com o acréscimo na população brasileira que era de 157 milhões em 1995 e alcançou 181 milhões de habitantes em 2004. (BRADSHAW; RAMSAY, 2009; PEREIRA e DANIELS, 2003).

Os principais estados produtores do Brasil são o Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina. A cultura da batata representa um importante gerador de divisas para o agronegócio brasileiro, com os estados de Minas Gerais (29%), São Paulo (25%) e Paraná (24%) responsáveis por 78% da produção nacional (LEONEL, 2005).

O Rio Grande do Sul é um dos maiores produtores de batata, superado apenas por Minas Gerais, São Paulo e Paraná, sendo que as principais regiões produtoras estão próximas à Pelotas, São Lourenço do Sul, Santa Maria, Ibiraiaras, Bom Jesus e Carlos Barbosa. A produção estadual está em torno de 14% da produção nacional, considerando-se que esta é de 2,2 milhões de toneladas/ano. A produtividade média no Brasil é em torno de 13t/ha, enquanto que a do RS é de 7,7t/ha.(FIOREZE, 2005; LEONEL, 2005).

2.2. Características nutricionais

A batata é um alimento basicamente energético, rico em carboidratos e proteína, sendo também importante fonte de minerais. Apresenta cerca de 20% de matéria seca, sendo que

dependendo do cultivar, condições de cultivo, época de colheita, terá sua composição alterada o que influenciará sua qualidade para o processamento (LEONEL, 2007).

A importância da batata como uma das principais culturas descontínuas do mundo está sendo reconhecida porque produz mais matéria seca e proteína por hectare do que as principais culturas de cereais. Com base no peso seco, o teor de proteína da batata é semelhante ao dos cereais e é muito elevada em comparação com as outras raízes e tubérculos. (BURTON, 1989; SBRT, 2007).

As batatas são uma fonte rica de proteína de alto valor biológico, além de: vitaminas essenciais: A, C, do complexo B (como niacina, tiamina e B6), minerais (cobre, magnésio, ferro, fósforo e potássio) e oligoelementos. A composição nutricional média de um tubérculo é apresentada na Figura 1. (USDA, 1978; LOPES e BUSO, 1999; SINGH ; KAUR, 2009).

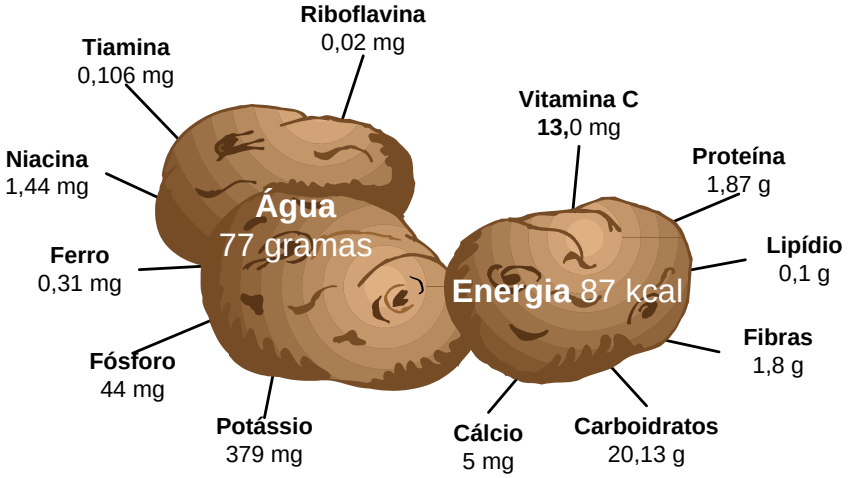


Figura 1 – Conteúdo nutricional da batata em 100g, após cozimento e descasque para consumo, adaptado de USDA, 1978

2.3. Processamento da batata

Conforme Leonel (2005), muitas são as formas de processamento da batata dentre elas a produção de fécula, flocos, farinhas e a grande quantidade de produtos extrusados como: amidos pré-gelatinizados, farinhas instantâneas, snacks, sopas, macarrões, biscoitos, etc. Entretanto, no Brasil o processamento é quase inexplorado.

2.3.1. Processo de produção dos flocos de batata

Batata em flocos é um termo utilizado para designar purê de batata em flocos, desidratado em secadores de tambor. Este processo é conhecido por mais de 50 anos e foi introduzido nos Estados Unidos pela Alemanha após a Primeira Guerra Mundial. O purê de batatas é reconstituído com água ou leite quente e se assemelha ao purê preparado com batatas frescas. A produção de batata em pó é relativamente fácil e barata. Além da batata, pode-se também produzir outros alimentos em pó ou em flocos de maneira bastante similar, como cebola, por exemplo, (LEONEL 2005; SBRT, 2007; VILLAGRAN, 2009).

O processo de conversão de batatas em flocos envolve muitas etapas. As principais etapas são: colheita e transporte, recepção, limpeza, descascamento, corte, pré-cozimento, cozimento, moagem, secagem e embalagem (Figura 2).

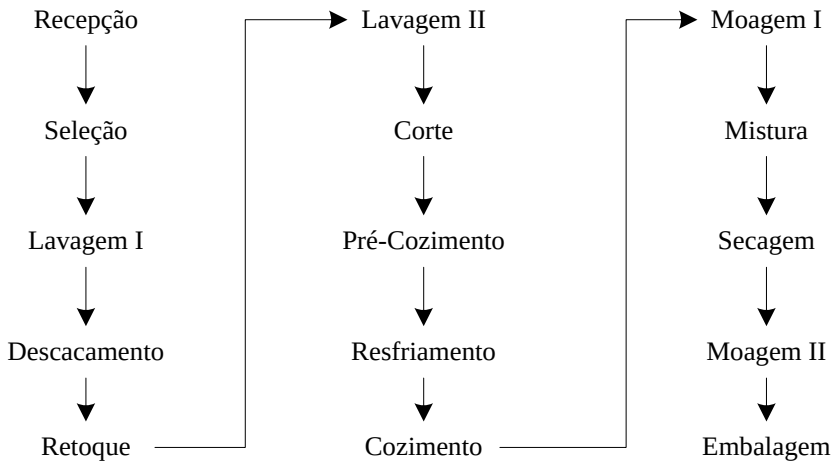


Figura 2 - Fluxograma da produção industrial de flocos dessecados de batata

Após a colheita, as batatas são limpas antes de chegar à indústria, a recepção é feita em um local próprio para evitar contaminações cruzadas. Ainda com a casca, devem ser lavadas para a eliminação de corpos estranhos. Após o descascamento feito por abrasão, é aplicada uma solução de 0,5% de Na_2SO_3 para prevenir o escurecimento antes do corte. O corte das batatas (0,25cm de espessura) tem o objetivo de melhorar a troca de calor nos estágios de pré-cozimento e cozimento.

O pré-cozimento é feito no material cortado e imersos em água a 71ºC durante 20 minutos. O cozimento final é feito usando vapor diretamente sobre as batatas e o tempo pode variar entre 14 a 40 minutos, devido à variação do teor de sólidos. A primeira etapa de moagem é feita num espremedor (*ricer*) devendo ser realizada logo após o cozimento. A secagem do purê é realizada em secadores de tambor simples (*drum dryer*). O purê é distribuído sobre toda a superfície do tambor até se obter uma camada uniforme com a espessura desejada e então é destacada do rolo e levada até o moinho de martelos. Nessa etapa, também chamada de flocagem, os flocos são triturados, promovendo boa textura e solubilidade ao produto. Os flocos devem ser acondicionados em embalagens que impeçam absorção de umidade, exposição à luz e possibilidade de esmagamento (AGUIRRE ; GASPARINO FILHO, 2002; LEONEL, 2005; SBRT, 2007; WINTECH TAPARIA LIMITED, 2011).

2.4. Amido

O amido $(C_6H_{10}O_5)_n$, é um polissacarídeo vegetal armazenado nas raízes, tubérculos e no endosperma de grãos de plantas, é uma reserva alimentar e a principal fonte de energia para os organismos fotossintetizantes (VACLAVIK; CHRISTIAN, 2008).

O amido, depois da celulose, é o carboidrato mais encontrado na natureza. Os cereais como o milho, arroz, cevada e seus produtos de beneficiamento, como os farelos, bem como os tubérculos e raízes (batata, mandioca, batata doce, entre outros sem expressão no Brasil) são as principais fontes de amido (REGULY, 1996).

Pela legislação brasileira, amido é o polissacarídeo extraído das partes aéreas comestíveis dos vegetais; e fécula é o produto extraído das partes subterrâneas, isto é, tubérculos, rizomas, raízes (BRASIL, 1976).

O amido não tem sabor, mas seus produtos de hidrólise apresentam gosto adocicado crescente da frutose até atingir a maltose.

> O amido se apresenta nos vegetais sob a forma de grânulos intracelulares, constituindo depósitos de reserva de carboidrato, formados na assimilação fotossintética. Esses grânulos são, na verdade, plastídios. Porém incolores por isso chamado de leucoplastos, orgânulos semelhantes aos cromoplastos que acumulam clorofila ou pigmentos carotenóides. São característicos para as distintas espécies vegetais, servindo mesmo de elemento de identificação quanto à sua forma, estrutura

> e tamanho. Permanecem intactos durante a maioria dos processos de obtenção do amido, mas devem ser rompidos quando deve haver hidrólise, principalmente a hidrólise enzimática, sem o que não há acesso espacial às enzimas (REGULY, 1996, p.45).

2.4.1. Amido na batata

Os amidos de órgãos subterrâneos das plantas (féculas) de: batata (*Solanum tuberosum*) e de mandioca (*Manihot esculenta*) são as mais predominantes fontes de amido industrial (NIBA, 2005). Segundo a mesma autora, a fécula de batata tem a capacidade de ligação de água elevada e um sabor suave, e é comumente usada na indústria de alimentos em muitas aplicações para o espessamento e alteração de textura.

As batatas recém-colhidas contêm cerca de 80% de água e 20% de massa seca. O amido é o principal componente da batata variando entre 15 a 20% do seu peso integral, este valor se situa em 17% na massa fresca. Comparado com outras fontes amiláceas como a mandioca (18-32%) e a batata-doce (32%) este valor pode ser baixo, mas levando em conta o alto teor de umidade, o amido é constituinte majoritário da MS da batata, cerca de 60 a 80 por cento da massa seca é o amido (BERTOFT ; BLENNOW, 2009; REGULY, 1996; SBRT, 2007).

Como um efeito, o amido é considerado um fator importante para a funcionalidade da batata na aplicação em alimentos. Para emprego industrial, o amido obtido de batata é considerado muito puro, em comparação com os outros tipos. Estas características combinadas fazem do amido de batata uma enorme fonte de biopolímero funcional para a ciência dos alimentos e dos materiais (LIU ; DONNER, 2009). Segundo os mesmos autores, em comparação com outros amidos de matérias-primas, a fécula de batata também tem algumas propriedades únicas que são diretamente atribuídas à sua estrutura molecular e granular, incluindo grânulos muito grandes e suaves, um elevado teor de fosfato covalentemente ligado, amilopectina de cadeias longas e amilose de alto peso molecular.

2.5. Componentes do amido

2.5.1. Composição química

O amido, também designado por α-1,4 glicano (ou glucano), é composto quimicamente por duas moléculas de polissacarídeos distintos, enroladas em espiral, mas separáveis, sendo o componente totalmente linear denominada amilose e o componente ramificado em uma estrutura arborescente, amilopectina (PARKER; RING, 2000).

Conforme Tester ; Karkalas e Qi. (2004), os grânulos de amido são constituídos por estes dois polissacarídeos, exclusivamente sendo o componente principal deles o monômero glicose. Normalmente, os dois componentes ocorrem juntos no amido, mas pode haver amidos que contenham apenas amilose ou amilopectina.

A amilose é um polímero essencialmente linear, solúvel em água, e a amilopectina é um polímero altamente ramificado, insolúvel em água, constituído por cadeias de amilose ligados a pontos de ramificação. A quantidade relativa de amilose e amilopectina depende da fonte de amido (REGULY, 1996; AEHLE, 2007).

Amilopectina, polímero ramificado, no qual as unidades de glicose estão ligadas em sua grande maioria por ligações α(1-6) o que confere à estrutura uma ramificação (BOBBIO e BOBBIO 2001). Segundo os mesmos autores o principal componente do amido é a amilopectina com 73-86% e o menor é a amilose com 14-27%.

A relação entre os dois polissacarídeos varia de acordo com a origem botânica do amido. Na Tabela 1 é apresentada a composição de amidos de diferentes fontes e relação entre polissacarídeos já citados.

Tabela 1 – Composição de amilose e amilopectina de amidos naturais de várias fontes

Produto natural	**% de amilose (a)**	**% de amilopectina (b)**	**(a) : (b)**
Amido de milho	24 – 27	70	1 : 2,8
Amido de arroz	15 – 18,5	79	1 : 4,6
Amido de trigo	20 – 25	80	1 : 3,4
Amido de mandioca	16,7 – 20	80	1 : 4,4
Amido de batata-inglesa	22 – 25	75	1 : 3,1

A amilose e amilopectina (Figura 2) têm diferentes estruturas e propriedades que tem sido discutidas e revistas por vários autores.

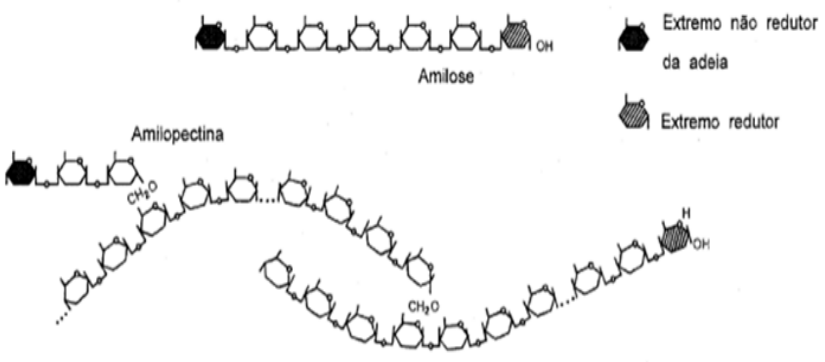


Figura 3 – Estrutura dos componentes da molécula de amido, Reguly (1996)

Através da engenharia genética já foram desenvolvidas variedades transgênicas de batata com dois extremos na composição do amido, o de alto teor de amilopectina (*Amylose-free*) pela modificação dos genes que regulam ramificações na cadeia do amido, e a variedade com alto teor de amilose, pela alteração do gene *GBSS* que controla a síntese de amilose, (CONNER, 2007).

Segundo o mesmo autor as batatas não eram adequadas para o cultivo comercial devido à severa redução do rendimento de amido e outros efeitos. No entanto com pesquisas posteriores foi adequado para uso em: plásticos biodegradáveis, produtos expandidos e operações formadoras de filmes.

2.5.2. Amilose

A amilose, um polímero linear da glicose, na qual as unidades piranosídicas constituem a molécula linear contendo, cerca de, 99% ligações α(1-4) e o restante de α(1-6) representando 20 a 26% da molécula do amido. Amilose é uma molécula relativamente longa, difere em tamanho e estrutura dependendo da origem sendo formada por 2000 a 5000 unidades glicose (Figura 4), (NIBA, 2005; BERTOFT ; BLENNOW, 2009;).

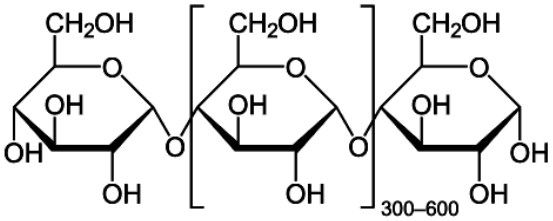


Figura 4 – Estrutura da amilose. Adaptado de Tester; Karkalas e Qi (2003)

A amilose se dissolve com dificuldade em água fria e tem um peso molecular de 10.000 a 50.000. Ela ocorre nas matérias-primas amiláceas conhecidas como cerosas, designação relativa ao aspecto ceroso do endosperma dos cereais que apresentam esta fração em maior percentagem (REGULY, 1996).

A amilose apresenta peso molecular de $1{,}5x10^5$—10^6 e tamanho médio da cadeia de aproximadamente 103 unidades de glicose. A amilose forma um complexo com o iodo, dando a coloração azul e é instável em soluções aquosas diluídas, formando um retículo pela propriedade de retrogradação (CEREDA *et al*., 2004). Os próprios autores em um comparativo do teor de amilose (Tabela 2) em várias fontes amiláceas com dois padrões obtiveram para a batata valores entre 16,5 até 36,2% do amido.

Tabela 2 – Teor de amilose % do amido (BS) de plantas amiláceas, usando dois padrões comerciais.

Nome cientifico	**Padrões de Amilose PA**	
	ICN	SIGMA
	g/100 de amido(*)	
Solanum tuberosum	26,2 ± 0,85	36,2 ± 0,77
S. tuberosum	16,5 ± 0,20	25,8 ± 0,54
S. tuberosum	24,5 ± 0,30	31,2 ± 0,54
S. tuberosum	21,6 ± 0,22	24,7 ± 0,48
S. tuberosum	26,8 ± 0,14	34,1 ± 0,16
S. tuberosum	22,0 ± 1,15	25,9 ± 1,33
S. tuberosum	26,6 ± 0,24	30,9 ± 0,27

(*) X ± IC; X valor médio e IC intervalo de Confiança n=3
Adaptado de Bermudez (1997).

Exemplos de conteúdo de amilose em várias fontes de amido incluem:

a) os grãos de cereais 26-28%;
b) raízes e tubérculos: 17-23%;
c) e variedades cerosas (*Waxy*) de amido: 0%.

A amilose enriquecida é empregada para filmes flexíveis, na produção de cápsulas para uso alimentar e em doces.

2.5.3. Amilopectina

Amilopectina, polímero ramificado, no qual as unidades piranosídicas estão ligadas em sua grande maioria como α(1-4); porém há também de 4 a 5% de ligações α(1-6), o que confere à estrutura uma ramificação tipo arborescente (Figura 5), (REGULY 1996; NIBA, 2005).

Amilopectina é o principal componente do amido em geral, e no cultivo da batata que normalmente constitui de 70-80% do seu peso, independentemente do tamanho dos grânulos (NODA *et al*. 2004). As moléculas de amilopectina constituem aproximadamente três quartos dos polímeros em um grânulo de amido. As cadeias são muito ramificadas (ocorrem a cada 15-30 unidades) e densas (mas menos ramificadas do que a forma de armazenamento de carboidrato nos animais, que é glicogênio e não o amido).

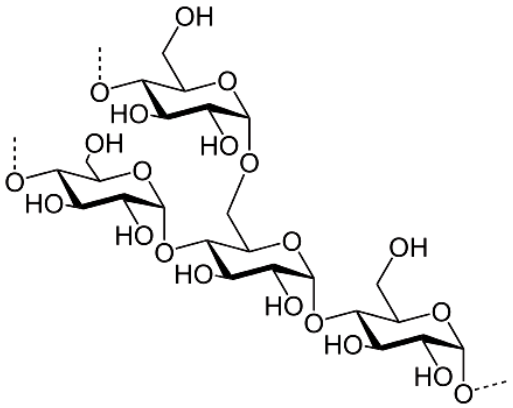


Figura 5 – Estrutura da amilopectina. Adaptado de Tester, Karkalas e Qi (2003)

A molécula de amilopectina possui um dos maiores pesos molecular (10^7—10^9) com a maioria na faixa de 10^8. Devido a seu caráter ramificado, as amilopectinas têm baixa viscosidade intrínseca (120-190 ml/g), apesar de seu gigantesco peso molecular (CEREDA, 2004).

Amidos com uma elevada percentagem de amilopectina vão espessar a mistura, mas não formam gel, porque ao contrário, as moléculas com amilose-amilopectina têm a capacidade de se associar e de fazer ligações químicas entre si. Quanto mais amilopectina, mais viscoso a pasta de amido e quanto maior a quantidade de amilose, mais forte o gel.

Compostos com a amilopectina enriquecida podem ser utilizados como um estabilizador na forma de alimentos preparados tais como embutidos sem pele como salsichas (AEHLE *et al*. 2007).

A amilopectina apresenta menos tendência para se reassociar ou reverter para uma estrutura mais cristalina de amilose, continua a ser uma solução, no entanto, ela forma um composto espesso após o resfriamento. Isso pode ser desejável em alimentos como recheios de torta (VACLAVIK ; CHRISTIAN, 2008).

2.5.4. Estrutura granular

O tamanho e forma e a estrutura dos grânulos de amido são característicos para as distintas espécies vegetais. Ao microscópio óptico o grânulo mostra ser constituído de uma massa homogênea, mas apresenta uma estrutura particular.

Esses grânulos são, na verdade, plastídios. Porém incolores, por isso chamado de leucoplastos, orgânulos semelhantes aos cromoplastos que acumulam clorofila ou pigmentos carotenóides (REGULY, 1996). Segundo o mesmo autor, o amido se apresenta nos vegetais sob a forma de grânulos intracelulares, constituindo depósitos de reserva de carboidrato, formados na assimilação fotossintética.

Verifica-se que a disposição em camadas nem sempre é visível, sendo bem pronunciada nos grânulos de amido de batata, que mostram um sombreado em forma de cruz de malta, quando examinados à luz polarizada; daí a birrefringência. A estrutura dos grânulos de amido de batata (Figura 6) pode ser observado os anéis amorfos alternandos pelos anéis semicristalinos.

Os grãos são elipsóides, ovais, periformes, arredondados, subtriangulares, com lamelas excêntricas e bem visíveis (Figura 7). O hilo é pontuado e excêntrico. Os grãos menores, de 6 a 15 μm, formam geralmente agrupamentos de dois ou mais grãos. Os grãos maiores variam de 40 a 70 μm, podendo chegar a 100 μm (CAETANO; DUARTE e SANTOS, 1995).

> Grãos simples, irregulares ovóides ou subesféricos, raramente agrupados aos pares ou a os três, característicos. Os ovóides são desigualmente alongados ou triangulares, de 30 a 100 μm de diâmetro; os subesféricos medem de 10 a 35 μ. O hilo é redondo, excentricamente disposto na parte mais estreita do grão, com estrias bem nítidas e concêntricas (BRASIL, 2005).

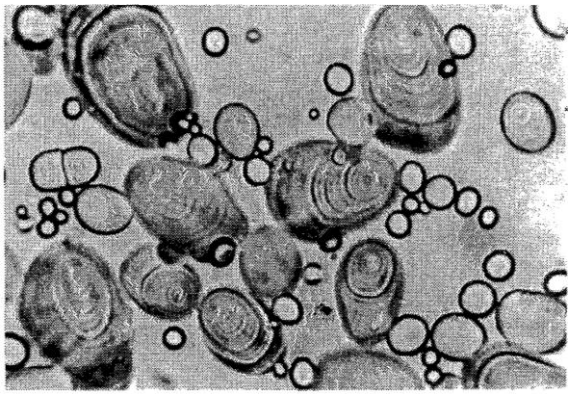


Figura 6 – Amido de batata, A.CZAJA, (1967 *apud* REGULY, 1996)

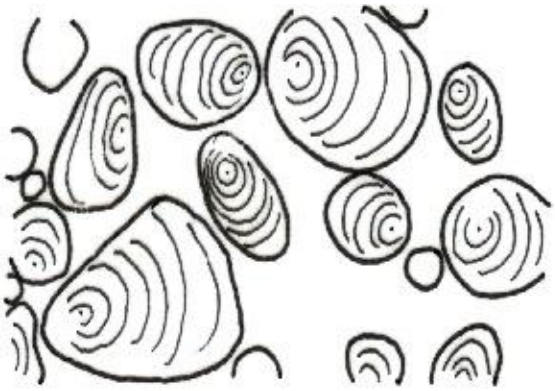


Figura 7 – Grânulos de batata, (CAETANO; DUARTE e SANTOS, 1995)

Os grânulos permanecem intactos durante a maioria dos processos de obtenção do amido, mas devem ser rompidos quando ocorrer hidrólise, principalmente a hidrólise enzimática, sem a qual não há acesso espacial às enzimas.

2.6. Enzimas

Enzimas são biocatalisadores, aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem dentro de células vivas, sem sofrer qualquer alteração geral dos agentes envolvidos. As enzimas utilizadas em processos industriais são produzidas atualmente em escala crescente através de processos fermentativos, utilizando-se bactérias e fungos em crescimento sobre meios nutritivos adequados.

A característica mais marcante da catálise enzimática é que a enzima se liga especificamente aos seus substratos e a reação ocorre nos limites do complexo enzima/substrato. Assim, para entender como uma enzima atua, precisamos conhecer a estrutura da enzima nativa e também a estrutura do complexo da enzima com seu substrato.

2.6.1. Nomenclatura de enzimas

As enzimas são conhecidas e estão sendo usadas na indústria há mais de um século. A fim de eliminar qualquer ambigüidade e sistematicamente nomear e classificar este crescente número de enzimas foi designada uma comissão pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUMBM). As recomendações da comissão e as atualizações mais tarde serviram como base do atual sistema de classificação e aceitas para a nomeação de enzimas que formam a nomenclatura enzimática desde seu primeiro relatório em 1961, (DOBLE, KRUTHIVENTI ; GAIKAR, 2004; AEHLE, 2007).

As enzimas são divididas em seis classes principais (Tabela 3), com base no total de reações catalisadas. A cada enzima foi atribuída um número de código, composto por quatro elementos, separados por pontos. O primeiro dígito indica qual classe a enzima pertence, o segundo e o terceiro dígitos do código indicam ainda o tipo de reação a ser catalisada, o quarto dígito descreve o substrato real que está sendo transformada.

Tabela 3 – Classificação internacional das enzimas*

Número	Classificação	Propriedades Bioquímicas
1	Oxidoredutases	reações de oxidação-redução
2	Transferases	transferência de átomo ou grupo entre duas moléculas
3	Hidrolases	reações de hidrólise
4	Liases	remoção de um grupo a partir do substrato (não hidrólise)
5	Isomerases	reações de isomerização
6	Ligases	catalisam reações em que dois grupos químicos são unidos utilizando energia fornecida pelo ATP.

*classe, código e tipo de reação catalisada

2.7. Enzimas amilolíticas

Segundo BRENDA (2011), as amilases são enzimas tem como forma de ação (endoenzima ou exoenzima) específicas para a clivagem do amido. As amilases degradam o

amido em compostos relacionados (Figura 8) pela hidrólise das ligações glicosídicas α-(1,4) e/ou α-(1,6).

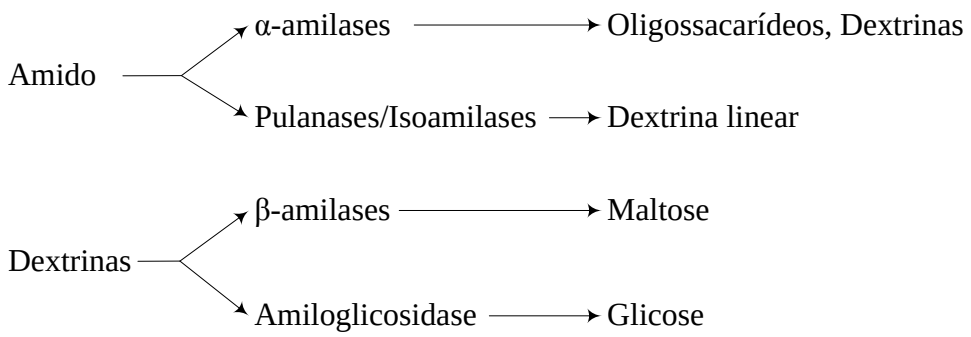


Figura 8 – Hidrólise enzimática do amido pelas enzimas amilolíticas, adaptado de Aehle (2007)

As endoenzimas tais como amilases agem em qualquer lugar nos grãnulos de amido e na cadeia de amido danificando e degradado. Os produtos da hidrólise de α-amilase são a glicose, maltose e dextrina, dependendo da extensão da hidrólise que ocorre, podendo ser desejável em processos industriais.

As exoenzimas como a β-amilase atuam nas extremidades não redutoras finais e em cadeias de amilose ou amilopectina. Esta hidrolisa o amido em duas unidades de glicose, produzindo maltose. A β-amilase não pode hidrolisar o amido além dos pontos de ramificação da amilopectina. A enzima amiloglicosidase hidrolisa as ligações α-(1,4) produzindo glicose e, lentamente ligações α-(1,6), no amido.

A dextrina pode ser degradada pela amiloglicosidase fazendo a liberação de glicose da dextrina oriunda do amido.

Na Tabela 4 estão elencadas uma variedade de enzimas que catalisam reações com grânulos de amido, incluindo a sua nomenclatura específica. Cada uma destas enzimas pode ser distinguida das outras com base na especificidade da reação.

Tabela 4 – Nomenclatura de enzimas importantes no processamento industrial do amido

EC nº		Nome Comum
3.2.1.1	α-1,4 D-glucan-glicanohidrolase	α-amilases
3.2. 1.2	α-1,4 D-glucan-maltohidrolase	β-amilases
3.2.1.3	α-1,4 D-glucan-glicohidrolase	amiloglicosidases
3.2.1.20	α-D-glucosídeo-glucohidrolase	α-glicosidases
3.2.1.41	α-dextrina-6-glicohidrolase	pululanases
3.2.1.68	Glicogênio-6-glucanohidrolase	isoamilases

Adaptado de Bobbio e Bobbio (2001); Brenda (2011)

2.7.1. Alfa-amilase

A alfa-amilase, α-1,4 glicano 4-glicanohidrolase, EC 3.2.1.1, é uma enzima que catalisa e cliva aleatoriamente e simultaneamente as ligações α-1,4, não atuando sobre as ligações α-1,6 do amido. Levando a produção de 70 a 90% de maltose, oligossacarídios e dextrinas além de pequenas quantidades de D-glicose (REGULY, 1996; AEHLE, 2007).

A ação enzimática se caracteriza por rápida diminuição da opacidade e da viscosidade das dispersões de amido, uma maior fluidez das mesmas, quando levadas ao ponto de gelatinização do amido, a α-amilase também é chamada de enzima dextrinizante e de liquefação. É uma enzima predominantemente de origem glandular pancreática e salivar. Cepas de *Aspergillus niger* selecionadas são boas produtoras de α-amilase fúngica. Entrentanto íons de metais pesados como: Ag, Hg^2, Cu^2, Pb^2, Fe^3, são inibidores da α-amilase (GOULD, 1975).

O uso fundamental da α-amilase está relacionado aos processos industriais de panificação, produção de álcool, bebidas alcoólicas, fabricação de xaropes de glicose, preparo de gomas de dextrinas e acabamento em papéis e tecidos (APAR *et al*., 2003; AEHLE, 2007).

2.7.2. Amiloglicosidase

Amiloglicosidase ou glicoamilase (AMG), EC 3.2.1.3, α-1,4 glicano-glicohidrolase, é uma exoenzima, que libera unidades de glicose a partir das extremidades não redutoras do amido, dextrinas, além da maltose, hidrolisando-as contínua e quase totalmente à D-glicose. Formam-se também cerca 2% de maltose, isomaltose e cerca de 3% de oligossacarídios. A enzima age em uma gama de ligações glicosídicas com maior afinidade nas ligações α-1,4/1,6; cinde também ligações α-1,3 e está presente no sangue e no meio de preparação de muitos bolores e bactérias. Entre as principais fontes de amiloglicosidase estão os fungos dos gêneros Aspergilius (*A. niger, A. orizae, A. awamori*), Rhizopus (*R. delemar*) e *Mucor* (*M. rouxianus*). A AMG atua na faixa de pH entre 3,0 e 5,5, tendo a atividade ótima no pH 5,0; e a maior estabilidade da enzima está entre 4,0 e 5,0 (REGULY, 1996; POLAKOVI ; BRYJAK, 2003).

A AMG tem uma grande importância em processos industriais na produção xaropes de glicose. Nos preparados enzimáticos pode haver a presença de contaminantes nocivos como a transglicosidase, que resulta em um baixo o rendimento de hidrolise, por este motivo, as enzimas devem ser purificadas para eliminar este agentes nocivos. Existe Também há inibição da enzima pelo produto por ela formado, pelo mecanismo conhecido como repressão catabólica (REGULY, 1996).

2.8. Processos biotecnológicos do amido

2.8.1. Biodegradação do amido

A ação de enzimas amilolíticas sobre grânulos de amido tem sido estudada e os amidos classificados em função da susceptibilidade. Em ordem decrescente de susceptibilidade são citados os amidos de: milho ceroso, mandioca, sorgo, milho, arroz, sagú, araruta e batata (CEREDA, 2004 p.118).

O amido pode ser biodegradado pelas enzimas α-amilase, β-amilase e amiloglicosidase (BELITZ; SCHIEBERLE e GROSCH, 2009).

O primeiro passo, para a sacarificação do amido a açúcares fermentáveis é a modificação da cristalinidade da macromolécula, estado natural do amido. A granulação e a cristalinidade é uma limitação à operação conhecida como liquefação do amido, condição prévia para que possa haver hidrólise enzimática do mesmo (REGULY, 1996). Segundo o mesmo autor se entende por que um cozimento ou liquefação deficiente causa sacarificação posterior incompleta.

2.8.2. Hidrólise de amido

Hidrólise do amido é a clivagem do polímero de amido para fragmentos de cadeia curta, como dextrina e maltose, ou monômeros de glicose. A hidrólise do amido é essencial em muitos aspectos para uso do amido. Os produtos da hidrólise do amido são múltiplos e incluem produtos como dextrinas e açúcares simples.

As fontes amiláceas requerem a reação do amido com a água (hidrólise) quebrando o mesmo em açúcares fermentáveis (sacarificação). Normalmente, o amido é misturado com água, que é então agitada e aquecida para ruptura dos grânulos. Enzimas específicas que fazem a cisão nas ligações químicas são adicionadas em vários momentos durante o ciclo de aquecimento.

A hidrólise é decorrida do intumescimento da macromolécula (amido) e sua solvatação, catalisada por agentes químicos (ácidos, bases e alguns sais) ou biológicos (enzimas) que favorecem a reação.

Conforme Niba (2005), a hidrólise do amido é realizada principalmente pelo uso de produtos biológicos (enzimas) ou produtos químicos (ácidos ou álcalis) ou em combinação de ambos. A hidrólise alcalina reverte o hidrolisado à condição de polímero, motivo pela qual não é utilizada. A Figura 9 mostra um esquema de processo em duas vias alternativas, uma pela ação de um ácido e outra pela ação de uma enzima.

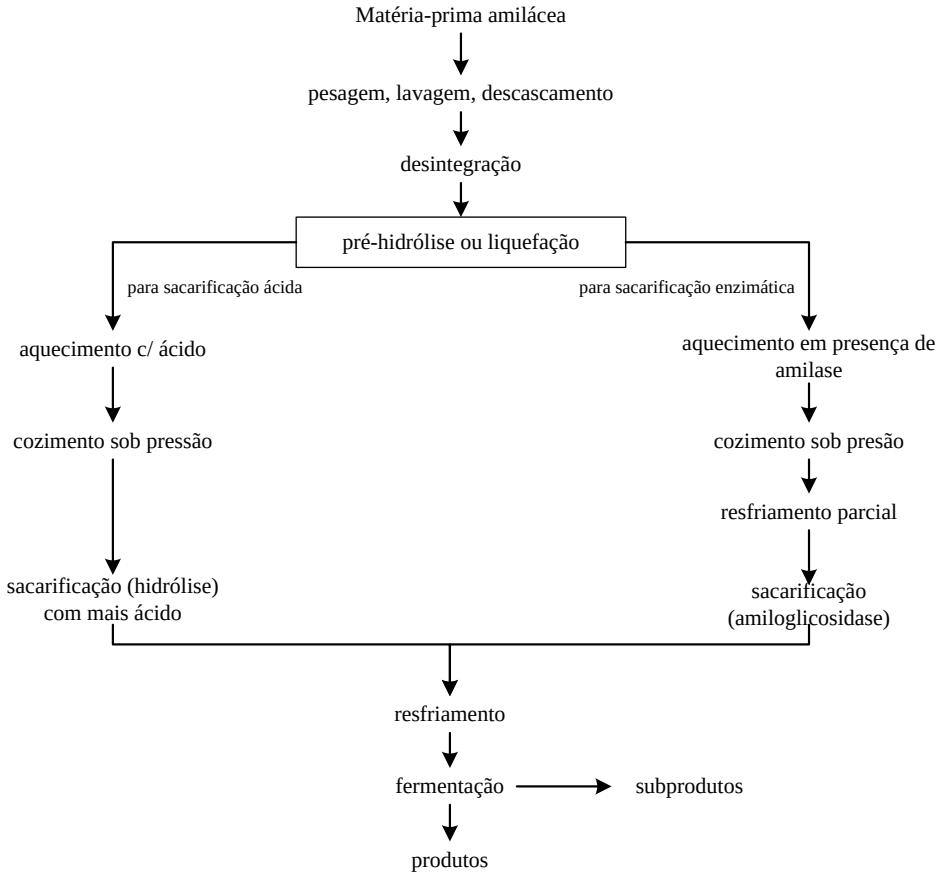


Figura 9 – Processo pré-fermentativo de amiláceos (2 vias alternativas), Reguly(1996)

2.9. Hidrólise enzimática do amido

O processo biológico de hidrólise se dá pela ação de enzimas. Elas podem ser concentradas, purificadas e utilizadas industrialmente. Da ação conjunta destas duas enzimas (amilase e amiloglicosidase) sobre o amido resultam no final, moléculas de maltose de moléculas de dextrinas-limite (com 3 a 4 resíduos de glicose) e, ocasionalmente glicose.

A despolimerização total desses polissacarídios origina a glicose, no caso do amido, da celulose e outros monossacarídios, em especial, pentoses no caso das hemiceluloses. A hidrólise parcial origina di-, tri- e oligossacarídios, além de frações maiores das moléculas originais, conforme as condições de hidrólise (REGULY, 1996 p.72).

Conforme Silva (1980), a produção de hidrolisados fermentados a partir de material amiláceos, envolve as seguintes etapas principais: preparo da matéria-prima, cozimento, hidrólise, fermentação, destilação.

Para processos biotecnológicos as etapas como: pré-hidrolise, liquefação e sacarificação para os processos biotecnológicos (Figura 10) se fazem necessárias na seqüência citada para que a matéria-prima amilácea atinja o propósito industrial desejado.

A hidró1ise enzimática é realizada em vasos providos de agitadores ou em colunas recheadas com a enzima imobilizada, o que permite uma alta relação entre o teor de enzima e o do substrato, sem que haja maior consumo de enzimas, nas condições ótimas de atuação do sistema enzimático usado.

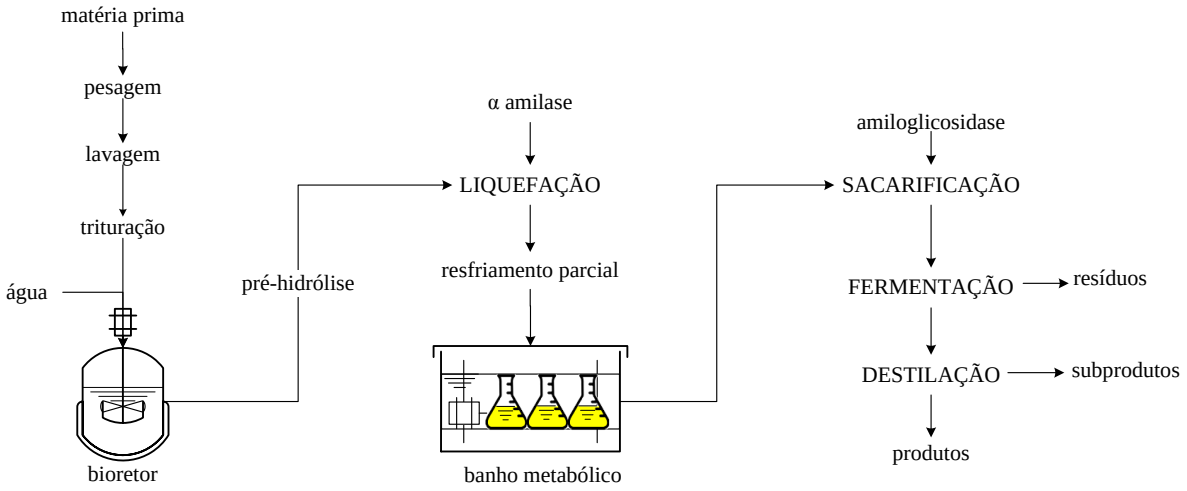


Figura 10 – Fluxograma do processo de hidrólise enzimática de substrato amiláceo

A hidrólise enzimática do amido é influenciada pela presença de componentes não-amiláceos, como lipídios, particularmente de lipídios ligados a amilose. Isso ocorre porque a presença destes complexos torna a amilose menos suscetível às enzimas Nebesny (2002 *apud* NIBA 2005).

A denominação de hidrolisados de amido reúne todos os produtos do seu fracionamento, independentemente dos catalisadores usados (ácidos, enzimas) ou do grau deste fracionamento.

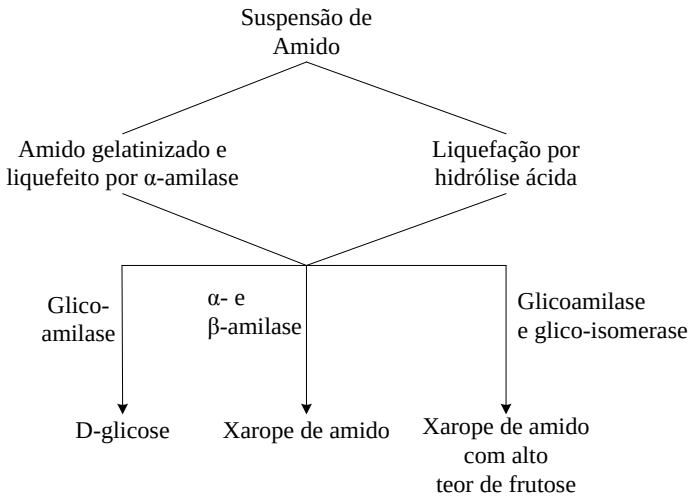


Figura 11 – Fluxograma das hidrólises ácida e enzimática do amido, Aehle(2007)

2.9.1. Pré-hidrólise e gelatinização

Toda a matéria-prima, após redução de tamanho, para efeitos de liquefação e sacarificação, deve ter o seu grânulo de amido hidratado. Esta etapa preliminar é essencialmente uma hidratação das macromoléculas, na qual os grânulos de amido primeiramente ligam-se a água, inchando-se e rompendo ao final.

É praticada pela absorção com água, sendo absolutamente obrigatória devida uma razão cinética e química do amido para acessibilidade aos agentes hidrolisantes. Como esta operação é fundamentalmente uma hidratação do amido, é acelerável pelo aquecimento da dispersão para que se chegue ao ponto de gelatinização (Tabela 5), o que torna o amido mais susceptível à ação dos ácidos e mais acessível às enzimas amilolíticas (amilases), favorecendo a interação entre o substrato e seu catalisador.

Não pode haver hidrólise com bom rendimento - próximo a 96% - em unidades de glicose, qualquer que seja o processo de hidrólise empregado, ácido ou enzimático, sem a pré-hidrólise (REGULY, 1996).

A hidrólise é normalmente realizada em duas etapas, sendo a primeira chamada de liquefação e a segunda de sacarificação. A pré-hidrólise envolve: 1) adição de ácidos que condiciona o mosto à hidrólise, como catalisadores para proporcionar o melhor pH para atuação de enzima; ou 2) adição de α-amilase, dita dextrinizante, que atua sobre os grãos de amido, rompendo-os, na faixa de temperatura aproximada à de gelatinização.

A água pode ser acidulada com ácido sulfúrico ou clorídrico, para ajustar o pH da pasta ao valor correspondente ao ótimo requerido pela enzima α-amilase, dextrinizante, que será adicionada como agente de liquefação (GOULD, 1975).

O cozimento do material amiláceo tem por objetivo a liberação do amido das células vegetais e a sua gelatinização, de maneira a permitir a ação do sistema enzimático usado no tratamento posterior. As condições de cozimento dependem da matéria-prima empregada, sendo que, de um modo geral, a temperatura se situa entre 80ºC e 150ºC, com tempos de até 90 minutos.

A gelatinização do amido é o rompimento da regularidade molecular dentro do grânulo de amido, resultando em: inchaço dos granulados, fusão dos cristalitos, perda de birrefringência, desenvolvimento de viscosidade, solubilização e lixiviação dos componentes solúveis, principalmente de amilose (CEREDA, 2003; HUBBER; MCDONALD; BEMILLER, 2005; LIU *et al.*, 2009).

Quando uma suspensão aquosa de amido é aquecida ou submetida a certo nível de energia, as ligações relativamente fracas em áreas amorfas entre as micelas cristalinas se dissociam ocorrendo expansão tangencial e hidratação progressiva para formar, eventualmente, uma rede de moléculas altamente debilitada, mantida unida pelas micelas ainda persistentes (ZIEMBA, 1965).

A energia requerida para a gelatinização difere entre os grânulos da mesma fonte botânica ocorrendo em uma faixa de temperatura. Na Tabela 5 estão elencadas algumas temperaturas de gelatinização para diferentes fontes de amido.

Tabela 5 – Temperaturas de gelatinização de amidos de diferentes fontes botânicas

Vegetal	**Temperatura ºC**		
	Início	Meio	Fim
Milho	62,0	66,0	70,0
Trigo	59,5	62,5	64,0
Batata	58,0	62,0	66,0
Mandioca	52,0	59,0	64,0

Segundo Reguly (1996), os grânulos de amido de milho permanecem ainda em grande parte intactos, mesmo a 90°C; ao passo que o amido de batata, que intumesce muito mais rapidamente, tem todos os seus grânulos rompidos a 80°C. A causa da diferença reside no tipo e tamanho do granulo, além da proporção entre o teor de amilose e amilopectina.

A gelatinização do amido é exigida antes da hidrólise enzimática, isso garante que a enzima tenha melhor acesso ao substrato (NIBA, 2005).

2.9.2. Liquefação ou dextrinização

A etapa de liquefação ou dextrinização tem esta denominação devido à ação da enzima α-amilase provocando nas características: física (redução drástica de viscosidade) e química, (formação de dextrina). A finalidade da liquefação é a transformação do amido em dextrina, pela ação da alfa-amilase, o que acarreta uma queda acentuada da viscosidade da pasta de amido gelatinizada (Figura 12).

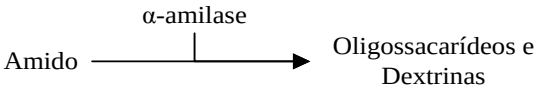


Figura 12 – Rota de ação da amilase sobre amido

Assim conforme o intervalo ótimo de temperatura indicado para a α-amilase a ser usada, mantém-se o aquecimento necessariamente abaixo da zona de gelatinização, mas o mais próximo da temperatura ótima de atividade da enzima, possibilitando a ação desta. Assim, a enzima de liquefação sob forma de preparado enzimático, pode ser adicionada junto com a matéria-prima, o ácido e a água, diretamente no reator.

Os fatores que influem em uniforme liquefação são: a granulometria após a moagem ou cominuição; a temperatura de cozimento; e a duração deste (REGULY, 1996, p.143).

Tendo em vista as propriedades diversas do amido, a bibliografia indica a forma mais desejável de utilização para métodos distintos de cada matéria-prima nos processos de: cozimento e sacarificação do amido.

Na Tabela 6 estes processos estão classificados quanto à sua aplicabilidade para diversas matérias-primas, a Figura 13 mostra o fluxograma industrial simplificado destes processos (SILVA, 1980).

Tabela 6 – Aplicabilidade dos processos de cozimento e liquefação do amido a diferentes matérias primas

Processos	**Matéria-prima**				
	Milho	**Trigo**	**Arroz**	**Batata**	**Mandioca**
Liquefação Ácida	A	A	A	A	A
Liquefação enzimática em um estágio	ÑA	ÑA	ÑA	EA	EA
Liquefação enzimática em três estágios (α-amilase Termoestável)	A	A	A	A	A
Liquefação Ácida/Enzimática	A	EA	A	A	A
Liquefação enzimática em três estágios (α-amilase Normal)	EA	A	EA	A	A
Liquefação enzimática em cinco estágios	A	A	A	A	A

(A) Aplicável; (ÑA) Não Aplicável; (EA) Especificamente Aplicável

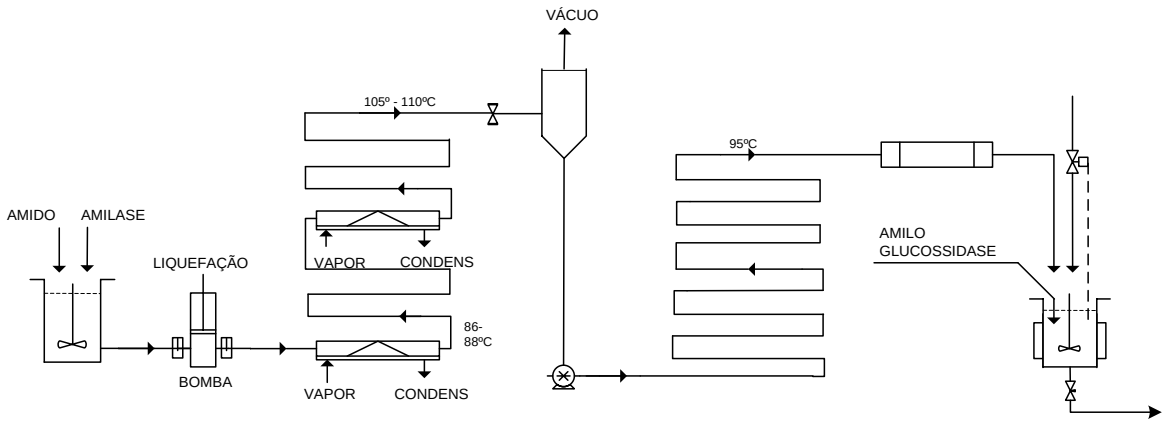


Figura 13 – Processo de cozimento contínuo e liquefação enzimática em um estágio do amido (Silva 1980)

2.9.3. Sacarificação

O amido liquefeito, constituído em sua maioria por oligossacarídeos, é transformado em hidrolisados contendo principalmente açúcares de baixo peso molecular. Este processo é chamado de sacarificação, REEVE (1992) e é realizado com ajuda de enzimas específicas, dependendo do tipo de hidrolisado desejado.

A finalidade da sacarificação pela ação da AMG (Figura 14), as dextrinas na qual são convertidas em carboidratos de pequeno peso molecular, assimiláveis pelas leveduras durante o processo de fermentação, não havendo necessidade de se alcançar um grau elevado de hidrólise antes da fermentação, visto que os processos de hidrólise e o de fermentação podem-se desenvolver ao mesmo tempo.

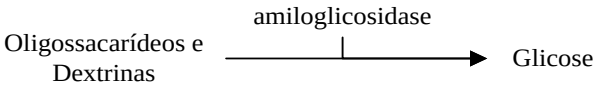


Figura 14 – Rota de ação da amiloglicosidase sobre carboidratos

Para esta fase da produção, a agitação não é tão importante como para a liquefação, servindo apenas para homogeneizar o meio e assegurar um contato adequado entre as enzimas e o substrato de amido liquefeito (SURMELY *et al*. 2003).

Um ponto importante é a possibilidade de contaminação microbiana que pode ocorrer durante a sacarificação. Dependendo do tipo de hidrolisado produzido e conseqüentemente da enzima de sacarificação usada, a temperatura para essa etapa varia entre 55ºC e 65°C, temperatura na qual pode ocorre o desenvolvimento de microrganismos e particularmente de leveduras, (SURMELY *et al*., 2003, p.440).

2.10. Uso do álcool

Atualmente procuram-se alternativas às tradicionais rotas de produção do etanol a partir de cana-de-açúcar e milho. Com o avanço da biotecnologia, têm sido criadas novas formas de produção do etanol, como a partir de materiais amiláceos e lignocelulósicos presente nas plantas – o etanol de segunda geração. A biomassa vegetal foi reconhecida como a mais abundante matéria-prima para produção de energia renovável. A utilização desta matéria-prima, de baixo valor econômico, oferece grande oportunidade para reduções nos custos de produção de etanol (SOUTO; QUIRINO, 2010).

Etanol (também conhecido como álcool etílico) é o mais comum dos alcoóis. É a forma de álcool que está em bebidas alcoólicas e é facilmente produzido a partir de milho, açúcar, frutas ou através da fermentação de carboidratos, sua estrutura química é C_2H_5OH, (MINTEER, 2006). Segundo o mesmo autor, o etanol foi considerado o "combustível do futuro" por Henry Ford e continuou a ser o combustível alcoólico mais popular por diversas razões entre elas por ser produzido a partir de produtos agrícolas (milho, açúcar, melaço, etc) ao invés de produtos petrolíferos não-renováveis.

Matérias amiláceas são viáveis como substratos e poderiam ser utilizadas como potenciais matérias-primas para fermentação visando a produção etanol (Tabela 7). Do que decorre o enorme valor destes materiais como fonte carboidratada para processos biotecnológicos, promovidos por microorganismos e/ou enzimas.

O resíduo de fluxos de indústrias de processamento de amido, obtidas após a separação do glúten de alto valor e a fração principal do amido, pode proporcionar um substrato de baixo custo para produção de combustível de etanol, bem como eliminar a necessidade de alternativas de tratamento de água de resíduos (HASHEM; DARWISH, 2010).

Conforme os mesmos autores, concluíram a possibilidade de utilização dos resíduos da fécula de batata como uma fonte econômica de biomassa para leveduras e a produção de bioetanol como combustível depois da hidrólise adequada, não necessitando de outros aditivos adicionais.

Tabela 7 − Diferentes matérias-primas para a produção de bioetanol e seus comparativos de potencial de produção

Cultura	Potencial de produção de bioetanol(L/ton)
Cana de açúcar	70
Beterraba	110
Batata doce	125
Batata	110
Mandioca	180
Milho	360
Arroz	430
Cevada	250
Trigo	240
Sorgo sacarino	60
Bagaço e outras biomassas de celulose	280

Fonte: Balat, Balat e Oz (2008)

2.11. Planejamento fatorial de experimentos e otimização de processos

Planejamento experimental consiste de uma série de técnicas utilizadas para explorar várias condições de funcionamento de um processo com o objetivo de encontrar: mais baixos custos de matéria-prima, de processo e produto; desempenho melhorado; menos variabilidade ou maior capacidade de produção (HUBBARD, 2003, p.232).

O emprego de métodos estatísticos objetiva alcançarem soluções otimizadas dos problemas experimentais, e vem se tornando cada vez mais freqüente em trabalhos, técnicas de otimização, que são ferramentas indispensáveis de auxílio à pesquisa, pois fornecem resultados a partir de um reduzido número de experimentos com sensível aumento na precisão das informações obtidas (COSTA, 2010).

2.11.1. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MRS) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G.E.P.Box na década de 1950, e que desde então tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS *et al*., 2010).

Uma das técnicas mais utilizadas na otimização estatística de experimentos é a MSR, que implica na representação de superfícies em três dimensões, provavelmente pela sua compreensão teórica, alta eficiência e simplicidade, demonstrando de forma simples, uma tendência na variável de resposta que deve ser analisada criteriosamente. O delineamento composto central rotacional (DCCR) apresentado nas Figuras 15 e 16 é o "design" clássico de modelos de superfície de resposta (ARTEAGA *et al*., 1994; HUBBARD, 2003; BARROS *et al*., 2010).

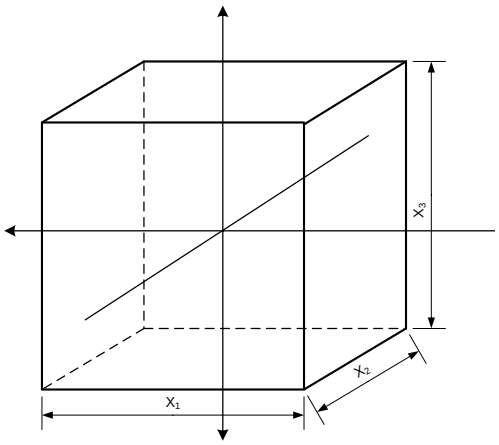


Figura 15 – Modelo tridimensional do Delineamento composto rotacional (DCCR)

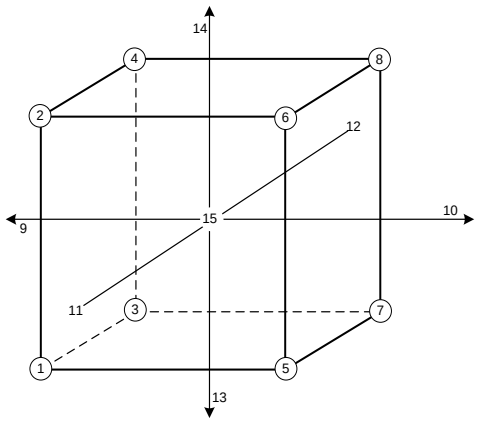


Figura 16 – Modelo pictórico de 15 pontos de um DCCR, adaptado de Hubbard (2003)

A MSR envolve quatro passos básicos:

1. seleção dos parâmetros do sistema (variáveis e seus níveis);
2. formulação do delineamento experimental (o mais comum é o delineamento central composto rotacional – DCCR);

3. encontrar o modelo (DCCR é adequado somente para modelos lineares e quadráticos – testes estatísticos avaliam a validade do modelo, incluindo a falta de ajuste e a análise de resíduo);
4. e encontrar as soluções ótimas (se o modelo for estatisticamente válido, pode ser usado para predizer o ponto ótimo do sistema) (ARTEAGA *et al*., 1994).

Após a determinação da região de interesse, busca-se um detalhamento desta área visando obter as condições nas quais a resposta será otimizada. O ponto ótimo pode ser determinado por inspeção, no caso em que o número de variáveis é pequeno, ou, caso contrário, por otimização numérica.

Esta metodologia é amplamente utilizada em otimização de processos de hidrólise de vários tipos de amido por diversos pesquisadores. Curvelo-Santana *et al.* (2010), estudaram a otimização da produção de álcool de mandioca, já López *et al*. (2005), estudaram a hidrólise enzimática do purê de castanha: empregando misturas de alfa-amilase e glicoamilase e Absar *et al*. (2008) avaliaram a hidrólise enzimática do amido de batata com diferentes quantidades de fósforo no meio de ensaio.

2.11.2. Otimização de Processos: Função Desejabilidade

A otimização de processos ou produtos torna-se de difícil solução, em razão do complicado processo computacional, quando está envolvida um número significativo de respostas (múltiplas respostas) e/ou a inspeção da região ótima não é facilmente identificada pela sobreposição das superfícies de resposta.

A técnica de otimização simultânea se baseia na transformação de uma função desejabilidade para cada variável de resposta, com valores descritos entre 0 e 1, onde 0 representa um valor completamente indesejado e a resposta transformada em 1 o valor mais desejável. Diferentes tipos de funções desejabilidade (d ou D) podem ser utilizados e dependem da resposta que se deseja obter, ou seja, se a mesma deve ser maximizada, minimizada ou mesmo assumir um valor intermediário.

Depois de transformar os valores previstos das variáveis dependentes em diferentes combinações de níveis das variáveis em um valor predito de desejabilidade individual, a desejabilidade global dos resultados em diferentes combinações de níveis preditos das variáveis pode ser calculada.

Ainda segundo Akhanazarova ; Kafarov (1982) os valores numéricos de d ou D e seus respectivos conceitos de qualidade, podem ser classificados de acordo com os índices sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores escalonados dos diferentes graus de desejabilidade e sua descrição da resposta qualitativa

Valores d ou D (desejabilidade)	Descrição da resposta (qualidade equivalente)
0,80 a 1,00	aceitável e excelente
0,63 a 0,80	aceitável e bom
0,37 a 0,63	aceitável porém pobre
0,20 a 0,37	valor limite
0,00 a 0,20	inaceitável

Fonte: Akhanazarova e Kafarov (1982)

O problema de otimização simultânea de diversas variáveis de resposta, em seguida, resume-se a selecionar os níveis dos fatores, aqueles que maximizem a conveniência geral das respostas sobre as variáveis dependentes. Assim, chegaremos a vários conjuntos de condições otimizadas, dentre os quais poderemos selecionar a que melhor nos convier.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

O amido utilizado foi de batata desidratada em flocos, produzida pela Unisur Alimentos (Chile), lotes 21T1 e 23T2, obtidos no comercio local. Optou-se por esta matéria-prima para garantir a manutenção das características desta, ao longo de todo o trabalho.

As enzimas utilizadas para conversão do amido foram a α-amilase Starmax® TG120 e amiloglicosidase ou AMG Starmax® GA400, produzidas do microorganismo *Aspergillus niger* e ambas cedidas pela Prozyn Biosolutions®.

3.2. Preparo da matéria-prima

Os flocos de batata desisdratada foram moídos para obtenção de "pó" e assim constituindo material necessário, ou substrato, para a preparação dos hidrolisados. Amostras foram moídas em Moinho de facas, com rotor circular (modelo: MA630, Marconi), equipado com peneira interna de 10 mesh para obtenção de partícula de tamanho apropriado para a realização dos ensaios e análises. Na seqüência substrato foi acondicionado em recipientes para uso posterior.

3.3. Métodos

3.3.1. Análises físico-químicas no substrato

As análises se desenvolveram nos laboratórios de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da (UTFPR) e no Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (ICTA/UFRGS).

Foram realizadas analise de granulometria, composição centesimal açucares redutores totais e teor de amido.

3.3.2. Análise granulométrica

Para a determinação do tamanho das partículas dos substratos foi utilizado o equipamento vibratório (Granutest) com jogo de peneiras, cujas aberturas da malha variaram de 0,045 mm a 2,0 mm, colocou-se aproximadamente 500 g de material moído em agitação por 15 minutos na velocidade máxima, anotando–se a quantidade de amostra em gramas retida em cada peneira (CEREDA ; CATÂNEO, 1986).

3.3.3. Composição centesimal

O substrato de batata foi caracterizado quanto à composição físico-química. A composição química do substrato foi determinada de acordo com metodologias descritas pela (AOAC, 2005; IAL, 2008). As amostras preparadas foram avaliadas quanto aos teores de: umidade, cinzas, proteína, matéria graxa, fibras, açúcares redutores (MILLER, 1959) e amido (AOAC, 2005).

O teor de umidade das amostras foi determinado usando-se estufa com circulação de ar a 105°C por 8 horas. Para a determinação do teor de cinzas ou resíduo mineral utilizou-se calcinação completa do material em forno mufla a 550°C por 24 horas. A análise do teor de fibra bruta foi feita através de digestão do material em solução de H_2SO_4 a 1,25% p/v por 30 minutos, seguida de NaOH 1,25% p/v por mais 30 minutos.

A determinação do teor de extrato etéreo foi realizada em extrator Soxleth completo, utilizando-se éter de petróleo para a extração. Para a avaliação do teor de proteína das amostras utilizou-se destilador Kjeldahl e bloco digestor, avaliando-se a porcentagem de nitrogênio na amostra. A conversão para proteína foi feita por fator 6,25.

A fração de extrativo não nitrogenado, compreende os carboidratos que não estão incluídos na fração fibra. Para o cálculo foram somadas as cinco determinações de

umidade,extrato etéreo, proteína bruta, fibra bruta e cinza sendo subtraído do total (100%) o resultado representa a fração glicídica e incorrendo também nela os erros experimentais.

3.4. Açúcares redutores totais

Para a determinação do teor de açucares redutores totais na amostra integral pela titulação de oxi-redução (Lane e Eynon) segundo método AOAC 31.034-6.

3.5. Amido

Para a determinação das frações do amido foi utilizado o método da AOAC 996.11. As amostras foram hidratadas e amido foi hidrolisado em maltodextrinas com uma amilase termoestável, a 95-100 ° C. A temperatura e o pH foram ajustados, e polissacarídeos foram quantitativamente hidrolisados à glicose com a amiloglicosidase altamente purificada. A glicose foi determinada com reagente peroxidase glicose-oxidase. O teor de amido foi calculado e relatado como o percentual na amostra de integral.

3.6. Enzimas

Para o uso da amilase nos reatores químicos foi utilizada 0,8μL/g de amido do produto enzimático e no uso da AMG foi feita variação 0,36 a 1,0 μL/g de matéria seca. Estas enzimas foram indicadas pelo fabricante para uso em processos de hidrólise visando à obtenção de álcool a partir de experimentos com milho. Não existindo informações em relação à batata. As concentrações e condições de uso e das enzimas e atividade foram as informadas pelo fabricante (Tabela 9).

Tabela 9 – Características dos concentrados enzimáticos

Enzima	tipo[a]	microrganismo[b]	AA[c]	T(ºC)	pH
Starmax TG120	α	*A.niger*	120	90	5,5-5,8
Starmax GA400	G	*A.niger*	400	60	4,3

a: G, glicoamilase; α, alfa-amilase. b: A., *Aspergillus*; c: AA, atividade amilolitíca expressos em unidades enzimáticas (EU) mL^{-1}

3.7. Planejamento experimental

O experimento foi montado como delineamento composto central rotacional (DCCR) para 3 variáveis com fatorial completo 2^3, incluindo 6 pontos axiais, 6 repetições no ponto central totalizando 20 ensaios (2^3+6pc+6 axiais=20 ensaios). O valor de depende do número de pontos do modelo fatorial (F) e do número de fatores (N), sendo calculado pela equação: = $(F)^{¼} = (2N)^{¼}$. Neste caso, com 3 variáveis: $(2^3)^{¼} = (8)^{¼} = 1,682$.

As três variáveis independentes foram: dosagem enzimática (E), concentração de substrato no meio (S) e tempo de reação (t). As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores utilizados no planejamento e valores codificados e reais do DCCR para a combinação dos fatores. As repostas foram açúcares redutores produzidos (Y1) e eficiência de hidrólise (Y2).

As faixas de variação entre o limite inferior e o superior de cada variável foram determinadas seguindo-se indicações da literatura e testes realizados anteriormente.

Tabela 10 – Valores utilizados no DCCR para os três fatores determinados

Variáveis independentes	**Variáveis codificadas**	**Níveis**				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Dosagem enzimática (μL/g de amido na MS)	X_1	0,36	0,49	0,68	0,87	1,00
% Substrato g/L (p/v)	X_2	3,00	3,81	5,00	6,19	7,00
Tempo (horas)	X_3	4,00	12,9	26,0	39,1	48,0

Para a manutenção da eqüidistância entre os valores das 2 variáveis independentes, foi utilizado cálculo proporcional, neste planejamento, com os fatores ou variáveis independentes codificados, sendo as respostas apresentadas em valores reais. Para transformar valores codificados das variáveis independentes em valores reais, empregou-se a Equação 1.

$$x = \frac{X - Y}{q} \tag{1}$$

Onde: *x*=valor codificado da variável X, *X*=valor real da variável, *Y*=valor real da variável no ponto central, *q*=intervalo de variação de X.

Tabela 11 – Valores codificados e reais do DCCR para a combinação dos fatores: concentrações de enzima, a percentagem de sólidos no meio e o tempo de reação da AMG

Ensaio	**Variáveis codificadas**			**Variáveis reais**		
N.º	X_1	X_2	X_3	Dosagem enzimática ($\mu L.g^{-1}$ MS)	Concentração de substrato (%)	Tempo (h)
1	-1	-1	-1	0,49	3,81	12:54
2	1	-1	-1	0,87	3,81	12:54
3	-1	1	-1	0,49	6,19	12:54
4	1	1	-1	0,87	6,19	12:54
5	-1	-1	1	0,49	3,81	39:06
6	1	-1	1	0,87	3,81	39:06
7	-1	1	1	0,49	6,19	39:06
8	1	1	1	0,87	6,19	39:06
9	-1,68	0	0	0,36	5,00	26:00
10	1,68	0	0	1,00	5,00	26:00
11	0	-1,68	0	0,68	3,00	26:00
12	0	1,68	0	0,68	7,00	26:00
13	0	0	-1,68	0,68	5,00	04:00
14	0	0	1,68	0,68	5,00	48:00
15	0	0	0	0,68	5,00	26:00
16	0	0	0	0,68	5,00	26:00
17	0	0	0	0,68	5,00	26:00
18	0	0	0	0,68	5,00	26:00
19	0	0	0	0,68	5,00	26:00
20	0	0	0	0,68	5,00	26:00

MS: Massa seca

Os resultados do DCCR foram usados para ajustar uma equação polinomial de segunda ordem e avaliados de acordo com os efeitos de cada variável de entrada e suas interações, verificando a validade da equação quadrática obtida tanto em termos de representatividade do modelo experimental.

3.8. Analises estatísticas

Todos os resultados foram submetidos à análise de dados pelo *software Statistica* (StatSoft, Inc., 1984-2007), versão 8.0, com uso da ferramenta *Experimental Design (DOE)* para à análise de variância, construção dos: diagramas de pareto, equações do modelo predito, superfícies de respostas, curva de contorno e perfis de desejabilidade.

3.9. Procedimentos

A degradação enzimática dos amidos com α-amilase e amiloglucosidase foi realizada segundo dados da literatura (REGULY, 1996, CEREDA, 2004) e adaptados ao substrato e aos equipamentos utilizados (Figuras 17 e 18). Todos os ensaios enzimáticos foram iniciados com a elaboração de uma suspensão de substrato de batata e água na concentração variável de 3 a 7% (p/v). As diferentes concentrações de sólidos utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir da solubilização de massa conhecida da preparação. Os mostos foram elaborados no Laboratório de Processos da DEQ/UFSM, de acordo com a com recomendação do fabricante, com pequenas modificações. A hidrólise (etapa de liquefação) foi realizada em bioreator e a fase de sacarificação em banho metabólico.

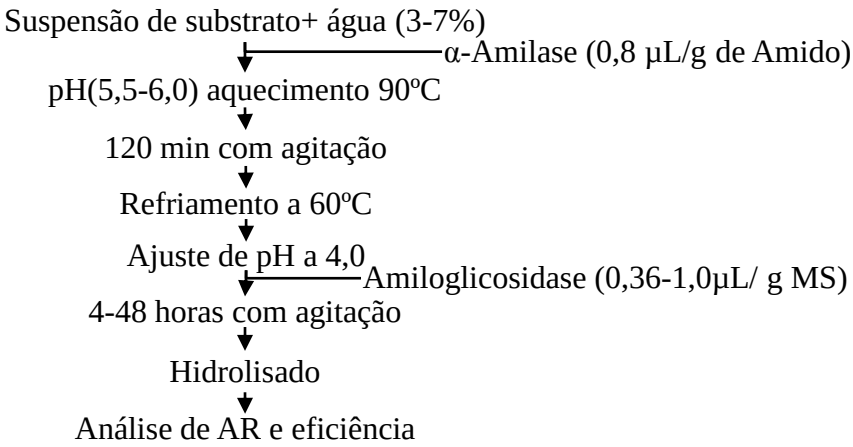


Figura 17 – Etapas do processo de hidrólise do amido empregado no processo experimental

3.9.1. Gelatinização e liquefação

A hidrólise-liquefação foi realizada em sistema de Bioreator piloto (modelo: 664/08, Metalquim), conforme figura 18, sendo realizada diluição com água destilada conforme determinado no planejamento experimental (tabela 11).

Efetuaram-se variação dos parâmetros, como: velocidade do rotor e temperatura por seus módulos em *software* Supervisorio, desenvolvido em Microsoft Excel®, com visualização e controle das variáveis do processo em tempo real. O vaso reacional de trabalho de 5,0L constituído de aço inoxidável. Os detalhes de funcionamento foram os seguintes: volume de trabalho, 2L; tipo moto-redutor, com três turbo hélices de angulação variável, temperatura de incubação 90º±5ºC e agitação de 300RMP.

A enzima liquidificante Starmax® TG120 PROZYN (São Paulo, SP) foi dosada na proporção de 0,8µL de enzima.kg^{-1} de amido. A dosagem adotada foi máxima recomendada pelo fabricante, tendo em vista que o objeto de estudo foi a fase de sacarificação e também conforme Apar *et al*.,(2003) demonstrado que o aumento na aplicação de alfa-amilase no mosto não fornece um incremento na eficiência da cisão do amido.

O ajuste de pH não foi necessária pois o mosto se encontrava próximo de 6,0, dentro da faixa ótima de 6,0 a 8,0. Não foi empregado cálcio para estabilizar a enzima. O aquecimento foi gradual até 90°C, com agitação de 360RPM, a temperatura foi mantida por uma hora, tempo necessário para gelatinização e liquefação do amido.

Figura 18 – Bioreator utilizado na fase experimental de liquefação do amido

As condições basais das reações foram (recomendações do fabricante):

Enzima: α-amilase(AA): 0,8µL da enzima/kg de amido.

Tempo de reação: 120 minutos.

Concentração de substrato 3 a 7% por volume de água (p/v).

3.9.2. Sacarificação

Após, o preparado liquefeito, foi resfriado a 60ºC em banho de gelo e transferido para os fracos de ensaio. Os ensaios de digestão enzimática foram performados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com uso da enzima sacarificante Starmax® GA400 PROZYN, o pH foi ajustado com ácido sulfúrico 1M para 4,0 dentro da faixa ótima de ação da enzima recomendada pelo fabricante. A figura 19 mostra o aparato experimental utilizado na realização dos ensaios da fase de sacarificação.

Figura 19 – Ensaios na fase de sacarificação em banho metabólico

Em seguida, o volume correspondente à emulsão foi distribuído em cada frasco, dando início à reação, foram adicionadas as dosagens conforme o planejamento do ensaio. Os frascos foram fechados com rolhas de borracha. A mistura permaneceu em agitação em banho metabólico tipo *Dubnoff* (modelo: MA093, Marconi) com controle automatizado de agitação e temperatura, galeria para 12 erlenmeyers de 250mL. Os detalhes de funcionamento foram os seguintes: volume unitário, 250mL; agitação reciprocante, de 200RMP, temperatura incubação 60±0,1ºC, tempo reacional de 4 à 48 horas, o período de permanência de cada ensaio na fase de sacarificação do amido e conseqüente conclusão da hidrólise.

Intervalos das variáveis independentes empregados:

Enzima: Amiloglicosidase(AMG) 0,36-1,0µL da enzima/kg de matéria seca.

Tempo de reação após a adição de amiloglicosidase: 4 a 48 horas.

Concentração de substrato 3 a 7% por volume de água (p/v).

3.10. Amostragem

O tempo inicial foi considerado como sendo o momento de adição da enzima sacarificante (AMG) no meio. Decorrido o tempo programado para os diferentes intervalos, foi retirada uma alíquota de cada frasco do ensaio, em triplicata, para constituir uma amostra composta do hidrolisado dos recipientes, conforme tempo determinado no planejamento (Tabela 12). Para finalização as misturas de reação coletadas foram aquecidas em banho-maria fervente durante 15 minutos para inativação da enzima.

Tabela 12 – Plano de amostragem para a variável X_3 ou (t) e seus valores para retiradas de alíquotas

X_3	t*	t**	Amostras	Intervalo	Amostras						Total
					1	2	3	4	5	6	
-1	12,9	12:54	6	2:09	2:09	4:18	6:27	8:36	10:45	12:54	12:54
-1	12,9	12:54	6	2:09	2:09	4:18	6:27	8:36	10:45	12:54	12:54
-1	12,9	12:54	6	2:09	2:09	4:18	6:27	8:36	10:45	12:54	12:54
-1	12,9	12:54	6	2:09	2:09	4:18	6:27	8:36	10:45	12:54	12:54
1	39,1	39:06	6	6:31	6:31	13:02	19:33	26:04	32:35	39:06	39:06
1	39,1	39:06	6	6:31	6:31	13:02	19:33	26:04	32:35	39:06	39:06
1	39,1	39:06	6	6:31	6:31	13:02	19:33	26:04	32:35	39:06	39:06
1	39,1	39:06	6	6:31	6:31	13:02	19:33	26:04	32:35	39:06	39:06
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
-1,68	4,00	4:00	6	0:40	0:40	1:20	2:00	2:40	3:20	4:00	4:00
1,68	48,0	48:00	6	8:00	8:00	16:00	24:00	32:00	40:00	48:00	48:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00
0	26,0	26:00	6	4:20	4:20	8:40	13:00	17:20	21:40	26:00	26:00

*Valor na escala decimal, em horas **Valor na escala hexadecimal, em horas

3.11. Análises dos hidrolisados

Após resfriamento, a concentração do potencial de hidrogênio foi determinada por equipamentos específicos. Amostras foram congeladas e posteriormente procedeu-se a feitas determinação de açucares redutores livres.

3.11.1. Açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores livres (AR) foram quantificados colorimetricamente pelo método do ácido dinitrosalicílico conhecido como DNS (MILLER, 1959). Construiu-se uma curva de calibração com uma solução padrão de glicose, lendo-se a absorbância em espectrofotômetro (Digimed DME-21) com comprimento de onda de 540nm.

3.11.2. Rendimentos e eficiências das hidrólises

A eficiência do processo é calculada sobre a quantidade de amido na matéria-prima que entrou no processo. O rendimento teórico da hidrólise ($Y_{TEÓRICO)}$ do amido foi obtido pela fórmula (equação 2) descrita por Santana *et al*. (2007) . Onde que: 180 é a massa molecular da glicose, 162 é a massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido, (M) a massa de amido em gramas e (V), o volume do bioreator.

$$Y_{TEÓRICO} = \frac{180/162 \times M}{V} \tag{2}$$

$$\text{Eficiência da Hidrólise}(\%) = \frac{Y_{REAL}}{Y_{TEÓRICO}} 100 \tag{3}$$

A partir dos valores de teóricos foi calculada a eficiência da hidrólise (equação 3), sendo Y_{REAL} é o rendimento de açúcares obtido na suspensão do ensaio (g/L), $Y_{TEÓRICO}$ é o rendimento que seria obtido da hidrólise total da massa de amido (g/L). O resultado é expresso em g/L.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo da matéria-prima

Nos ensaios preliminares realizados para indicar a melhor forma de utilização da matéria-prima: batata “in natura”, seca em estufa ou em flocos dessecados, selecionou-se a batata em flocos, obtendo-se uma espécie de farinha após a moagem. Este processo foi selecionado por ser de fácil execução, condução e repetição no laboratório para os ensaios posteriores.

Desta forma, o mais indicado foi a matéria prima seca triturada por moagem, a qual alterando a forma física do alimento, permitia uma maior facilidade de acesso das enzimas amilolíticas (MUIR & O'DEA, 1992).

A utilização desta forma de material proporcionou uniformidade da matéria-prima durante todo o período, mantendo características semelhantes durante todas as etapas do experimento. Fato não visualizado com produto batata “in natura” devido suas característica de pós-colheita se modificar.

As perdas durante a fase de armazenamento são inevitáveis, pois a composição química e as condições fisiológicas dos tubérculos sofrem variações, além de as condições ambientais não serem constantes durante todo o período (HIRANO, 2003).

4.2. Análises do substrato de batata

A composição dos flocos moídos foi de 7,31% de umidade, 74,73% de amido, 87,30% de carboidratos, 0,58% de açúcares redutores, 0,75% de fibra bruta. O substrato de batata é portanto, um alimento basicamente amiláceo, com teor considerável baixo de açúcares simples, conteúdo lipídico e fibroso. A caracterização físico-química completa do substrato de batata analisado encontra-se na tabela 13.

Tabela 13 – Composição físico-química do substrato de batata dessecada

Variável (g/100g)	Flocos de batata moídos
Umidade	7,31
Cinzas	2,36
Fibras	0,75
Proteínas	7,60
Extrato etéreo	2,03
Carboidratos	87,30
Açúcares redutores	0,58
Amido	73,74

A composição centesimal do substrato de batata foi compatível com os obtidos na literatura e similares comerciais apresentando algumas variações (Tabela 14).

Tabela 14 – Comparação da composição química da amostra de flocos de batata dessecados com produtos comerciais semelhantes

Determinação	A.I[1]	UFRGS	Nestlé[2]	Yoki[2]	Nutrimental[2]
Lipídio	2,03	0,0	0,0	0,0	0,9
Proteína	7,6	7,69	6,66	8,0	6,6
Fibra bruta	0,75	0,0	0,0	*	*
Carboidratos	87,3	84,61	76,19	80,0	77,0

1 – Amostra integral 2 – Similar comercial * Valor não estabelecido

A porcentagem de umidade foi compatível ao recomendado pela indústria na faixa otimizada de 7 a 9% (VILLAGRAN *et al*., 2009) e inferior ao informado pelo similar comercial (8,5%), o teor este em conformidade com os valores de umidade do substrato especificados na ANVISA, que variam de 8 a 15% (BRASIL, 1978). Em relação à proteína, o valor encontrado (7,6%) foi semelhante quando comparado aos valores mostrados por ICTA (2003), e superior a Nestlé (2011) e Nutrimental (2011), os quais encontraram o valor de 6,66 e 6,6% respectivamente para a proteína, enquanto a marca Yoki (2011) detectou 8,0%.

Também em relação à quantidade de fibra bruta, não foi possível estabelecer comparação com alguns similares (Yoki e Nutrimental) pois estes informaram o teor de fibra alimentar, um das frações que compõem a FB, já para ICTA (2003) e Nestlé (2011) apresentam valores inferiores a 0,75%.

O teor amiláceo ou de amido da amostra (Tabela 13) ficou abaixo do limite da legislação (CEREDA, 2004) para amido: mínimo de 80,00% p/p. Este valor não se diferencia muito da farinha de mandioca, outro tubérculo rico em amido, que possui 70% de amido em sua formulação, segundo a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA – ANVISA (BRASIL,1978), e da farinha de trigo, que possui de 65 a 72% de amido FREITAS *et al*. (2005). Já o resíduo mineral (cinzas) ficou 4,6 vezes acima do que determina a mesma resolução.

Os valores restantes dos componentes do substrato devem-se aos carboidratos, valor muito próximo ao encontrado por ICTA (2003), e Yoki (2011) e inferior ao mostrado por Nestlé (2011) e Nutrimental (2011) com 76,19 e 77,0% respectivamente. Demonstrando que a batata é alimentos basicamente constituído por carboidratos.

As variações apresentadas entre os valores de composição centesimal encontrados na análise da amostra integral (AI) em estudo e os da literatura, podem estar relacionadas a diversos fatores, como o clima, tipo de solo e fertilidade, temperaturas, práticas agronômicas, maturidade de tubérculos, condições ambientais de cada safra, além dos fatores intrínsecos de cada cultivar, que interferem na quantidade de nutrientes da composição centesimal do tubérculo de batata (PATIAS *et al*., 2008).

Os resultados do ensaio de granulometria dos flocos de batata moídos são apresentados na Tabela 15. Conforme a análise 97,65% das partículas possui um tamanho de 20 a 200 mesh (0,125 - 0,7 mm). O substrato classificado teve uma retenção de 47% da massa total, acima do encontrado por Walter (2005) para faixa recomendada na análise do teor de amido. Segundo Rocha (2008), os grânulos pequenos são mais suscetíveis ao ataque enzimático principalmente devido à sua maior área superficial por unidade de peso disponível para adsorção das enzimas.

Tabela 15 – Distribuição da fração granulométrica da amostra

Peneiras		**Material retido (gramas)**	**Fração granulométrica**		
Tyler (Mesh)	mm		% Retida	% Retida Acumulada	% Passante
10	2,000	0,10	0,02	0,00	100,00
12	1,680	0,20	0,04	0,04	99,96
16	1,190	0,30	0,06	0,10	99,90
20	0,841	4,10	0,81	0,91	99,09
24	0,710	93,50	18,47	19,38	80,62
28	0,600	115,70	22,85	42,23	57,77
32	0,500	37,70	7,45	49,67	50,33
35	0,425	76,30	15,07	64,74	35,26
42	0,355	44,20	8,73	73,47	26,53
48	0,300	41,40	8,18	81,65	18,35
60	0,250	19,70	3,89	85,54	14,46
100	0,150	42,90	8,47	94,02	5,98
200	0,125	23,00	4,54	98,56	1,44
250	0,075	2,20	0,43	98,99	1,01
325	0,045	3,30	0,65	99,64	0,36
Fundo		1,70	0,36	100,00	0,00

Os componentes (Figura 20) apresentaram-se soltos ou aglomerados, porém íntegros de coloração amarela clara, com odor característico e livre de odores estranhos.

Figura 20 – Foto dos flocos de batata dessecados após moagem

4.3. Perfis dos ensaios experimentais

4.3.1. Rendimentos de AR e eficiências das hidrólises

O rendimento do processo foi calculado sobre a quantidade usada de matéria-prima, mais comumente considerando a quantidade de amido que entrou no processo. É normal encontrar rendimentos acima de 100% (CEREDA, 2004).

Conforme a mesma autora, o fracionamento do amido em cadeias menores é acompanhado pela adição de uma molécula de água (hidrólise) em cada ligação rompida, o que acarreta aumento do peso de amido fracionado e conseqüentemente um aumento do rendimento.

Para exemplificação (conforme a equação 1), o valor teórico de glicose é calculado pela divisão da massa molecular da glicose pelo valor do monômero da glicose na molécula de amido, fornecendo um valor de 1,10, o que geraria para 1g de amido 1,1g de glicose, logo um rendimento de 110%.

4.3.2. Avaliação das variáveis dependentes do desenho experimental

Para avaliar a influência das variáveis independentes – concentração de substrato de batata (S), dosagem enzimática (E) e tempo (t) após adição da enzima AMG – sobre as variáveis dependentes: AR (Y1) e eficiência de hidrólise (Y2), foi elaborada um planejamento fatorial completo (Tab. 10). Os resultados obtidos a partir dos 20 experimentos laboratoriais, executados aleatoriamente, encontram-se na tabela 16.

Tabela 16 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 com as respostas Y1 (acurares redutores) e Y2 (eficiência de hidrólise)

	Variáveis codificadas			**Variáveis reais**			**Respostas**	
Ensaio	X_1	X_2	X_3	E(µL)	S(%)	t(h)	AR ($g.L^{-1}$)	Efic. (%)
1	-1	-1	-1	0,49	3,81	12:54	31,6164	101,2818
2	1	-1	-1	0,87	3,81	12:54	31,6233	101,3039
3	-1	1	-1	0,49	6,19	12:54	33,7247	66,4968
4	1	1	-1	0,87	6,19	12:54	34,8784	68,7717
5	-1	-1	1	0,49	3,81	39:06	32,1786	103,0828
6	1	-1	1	0,87	3,81	39:06	32,9774	105,6417
7	-1	1	1	0,49	6,19	39:06	34,9376	68,8884
8	1	1	1	0,87	6,19	39:06	34,9671	68,9466
9	-1,68	0	0	0,36	5,00	26:00	33,0452	80,6644
10	1,68	0	0	1,00	5,00	26:00	33,2918	81,2664
11	0	-1,68	0	0,68	3,00	26:00	30,9443	125,893
12	0	1,68	0	0,68	7,00	26:00	35,5505	61,9857
13	0	0	-1,68	0,68	5,00	4:00	30,7178	74,9832
14	0	0	1,68	0,68	5,00	48:00	32,6014	79,5811
15	0	0	0	0,68	5,00	26:00	31,7237	77,4386
16	0	0	0	0,68	5,00	26:00	33,0748	80,7367
17	0	0	0	0,68	5,00	26:00	32,3648	79,0036
18	0	0	0	0,68	5,00	26:00	31,9999	78,1128
19	0	0	0	0,68	5,00	26:00	31,8717	77,7999
20	0	0	0	0,68	5,00	26:00	32,3401	78,9433

* Os valores de eficiência são referentes ao calculado conforme equação (2).

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes regressão, podendo-se elaborar os modelos com as variáveis codificadas. Os modelos matemáticos empíricos, codificados e de 2ª ordem, encontrados, com seus respectivos coeficientes

estatísticos estão apresentados nas Equações 4 e 5, onde os valores em negrito são os parâmetros estatisticamente significativos que foram obtidos a partir das regressões não lineares (modelo quadrático) dos dados experimentais, utilizando o *software* Statistica®.

$$\mathbf{AR}=\mathbf{32,20772}+0,1761E+\mathbf{0,4676E^2}+\mathbf{1,30822S}+\mathbf{0,49671S^2}+\mathbf{0,46775t}-0,06586t^2+0,04719ES-0,04154Et-0,07684St \quad (4)$$

$$\mathbf{Efic}=\mathbf{78,6341}+0,4343E+\mathbf{1,056S^2}-\mathbf{17,9975S}+\mathbf{5,6528E^2}+\mathbf{1,2041t}-0,2491t^2+1,2041ES-0,04Et-0,4465St \quad (5)$$

Verifica-se que os modelos que descrevem as respostas Y1 e Y2 em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, são adequados visto que a variação explicada pelo modelo é de 91,28% e 99,49% para ambas as respostas respectivamente e os F calculados altamente significativos ($p<0,001$).

Considerando que o modelo quadrático foi corroborado para as respostas: AR e eficiência de hidrólise, logo satisfazendo os requisitos para a construção das superfícies de resposta (SR), o mesmo foi usado tendo como objetivo de otimização (maximizar) do processo. Os modelos foram altamente expressivos, podendo-se definir regiões de interesse. A análise destas figuras permite a definição das condições mais adequadas que maximize a produção de Y1 e Y2.

O DCCR utilizado neste processo foi muito importante para avaliar os fatores que afetam a hidrólise com altas concentrações de amido, dosagem enzimática e período de reação. O emprego do DCCR torna plausível definir quais são as faixas mais apropriadas para cada resposta esperada.

4.4. Concentração de Açúcares redutores livres

Os valores das concentrações de AR expressos em g/L resultantes dos 20 ensaios experimentais realizados no presente trabalho estão descritos na Tabela 16. O teor AR (g/L) máximo e mínimo nos ensaios foi de 35,6 e 30,7 respectivamente, o qual corresponde um valor médio de 33,13g/L. As hidrólises desenvolveram-se dentro dos parâmetros normais como relatados na literatura (SURMELY *et al.*, 2003).

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a resposta Y1 estão descritos na tabela 17, onde se nota que 91,28% da variação experimental observada é explicada pelo modelo. Observa-se, ainda, que o valor de $F_{calculado}$ é maior aproximadamente 4 vezes do que o valor de $F_{tabelado}$ a um nível de confiança de 95%. Desta forma, pode-se assegurar que o referido modelo ofereceu significância estatística e que o mesmo pode ser empregado para fins preditivos.

Tabela 17 – Análise de variância do modelo ajustado para a resposta Y1 (açucares redutores)

Fonte de variação	**Soma quadrática**	**Grau de liberdade**	**Média quadrática**	**Teste F**	**p**
Regressão	33,60299	9	3,73367	11,7569	0,00032
Resíduos	3,17574	10	0,31757	-	-
Total	36,45679	19	-	-	-

$F_{tab\ (9,10)}$ = 3,02 Fonte: Barros Neto, Scarminio e Bruns (2001).

A Figura 21 apresenta os valores observados experimentalmente versus os valores previstos pelos modelos para as respostas Y1, observando-se uma boa concordância entre eles como era esperarado pelo resultado das análises de variância. Observa-se que os erros de ajustamento independentes e normalmente distribuídos em torno da reta.

Efetuou-se a análise da influência dos parâmetros em função das respostas. Para tanto é necessário determinar quais parâmetros realmente apresentam influência estatística significativa ao nível de significância de 95%, e isso pode ser observado por meio do Diagrama de Pareto (Figura 22) pode-se verificar que as variáveis, teor de substrato e tempo de reação, todas do modelo linear, dosagem enzimática e teor de substrato, todas do modelo

quadrático, mostraram se estatisticamente significativas. Observa-se também que o teor de substrato foi o mais relevante de todos os parâmetros.

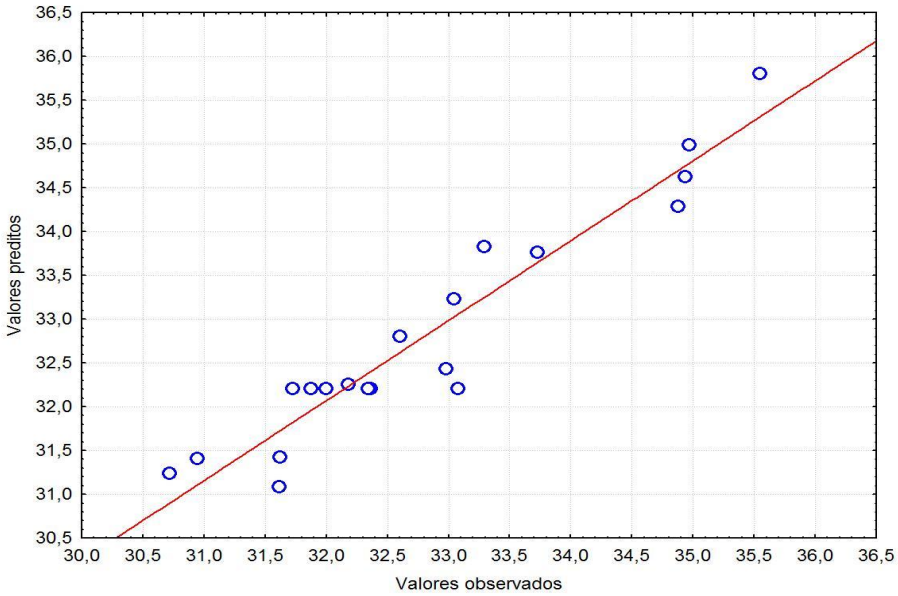


Figura 21 – Gráfico dos valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta Y1

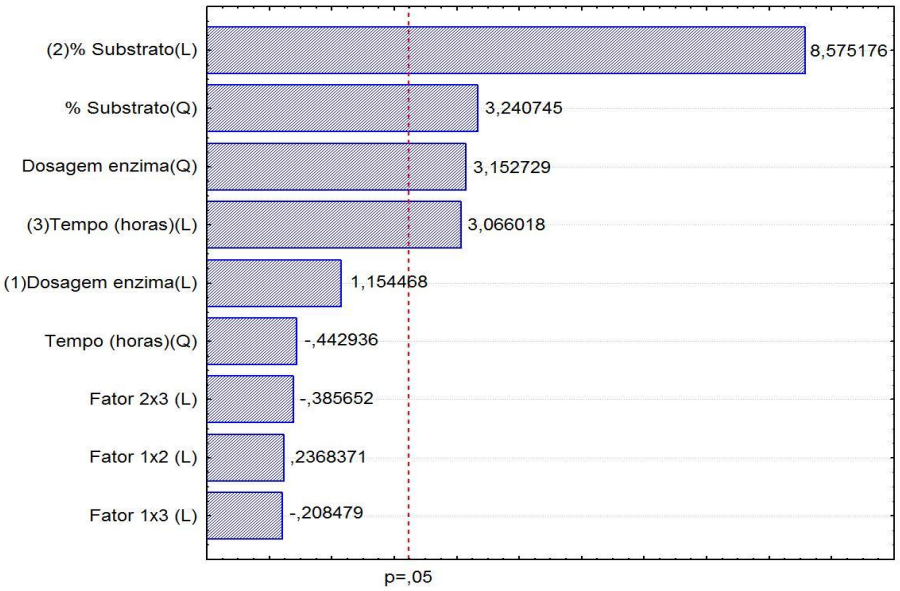


Figura 22 – Diagrama de Pareto para a resposta Y1

As Figuras 23 e 24 apresentam os efeitos da dosagem enzimática (E) e substrato (S) no teor de AR liberado (resposta Y1), estando o tempo fixado em 26h (ponto central). Observa-se que se fixando os níveis de concentração de substrato em 7% e de enzima em 1,0µL,

obtém-se produtividade maximizada, levando a pressupor que uma quantidade maior de substrato e enzima gere um resultado ótimo.

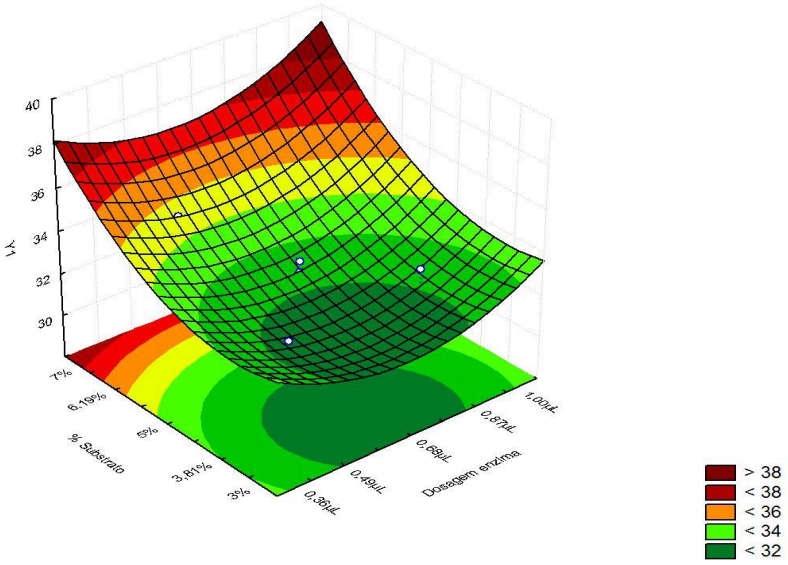


Figura 23 – Superfície de resposta para a Y1 (g/L) em função de E (µL) versus S(%)

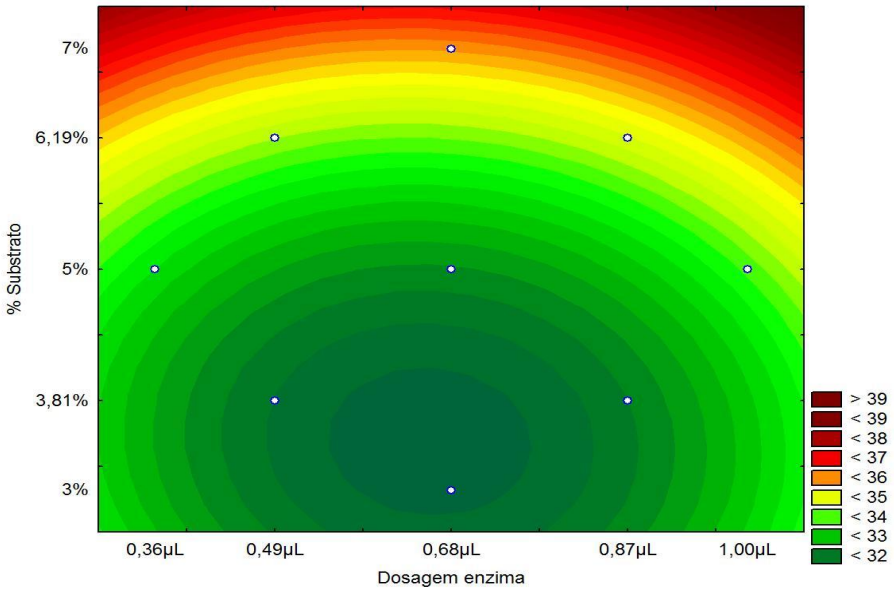


Figura 24 – Curva de contorno para resposta a Y1 (g/L) em função de E (µL) versus S(%)

A Figura 25 e 26 apresenta os efeitos da dosagem enzimática (E) de AMG e tempo (t) na resposta Y1, com o valor de (S) fixado no ponto central (5%). A produtividade é otimizada quando (E) fixado no nível máximo (1,0µL) será necessário um nível de tempo médio de 26h, ou seja, a duração de tempo é reduzida com aumento de (E).

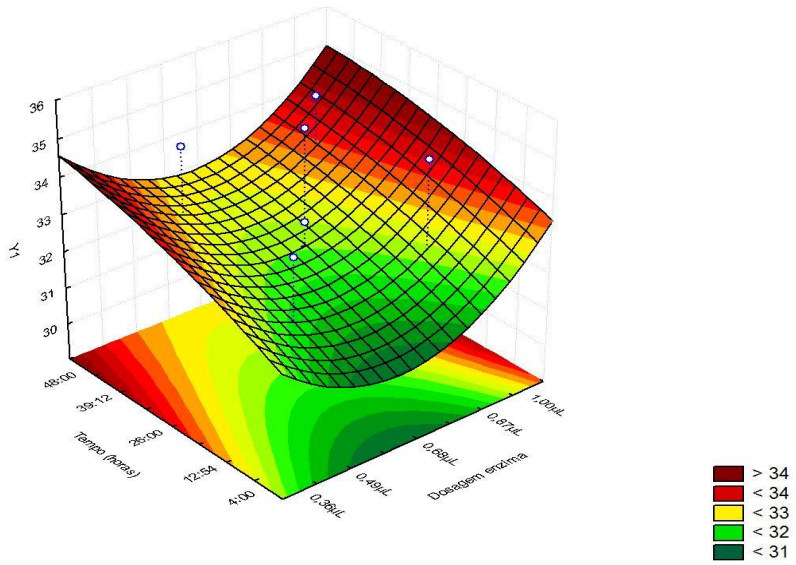


Figura 25 – Superfície de resposta para a Y1 (g/L) em função de E (%)versus t(h)

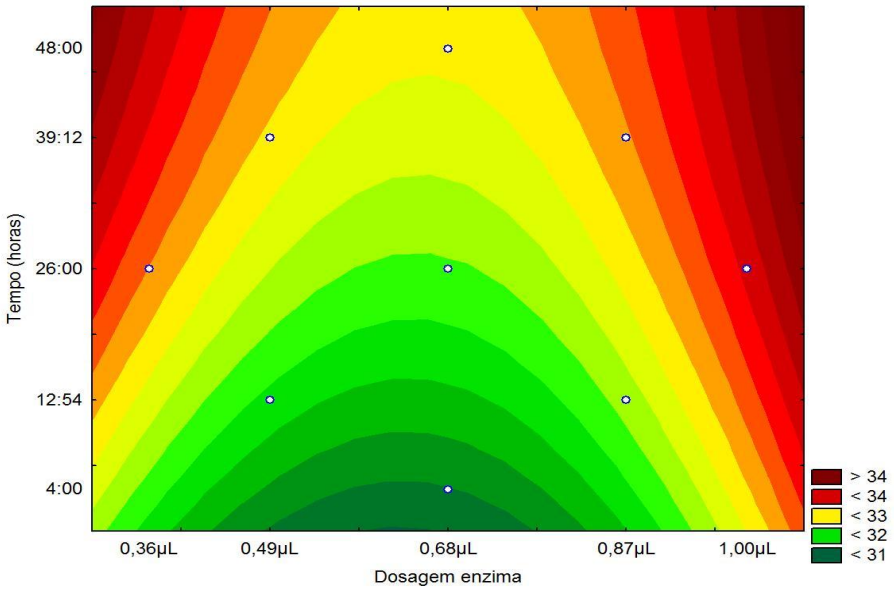


Figura 26 – Curva de contorno para resposta a Y1 (g/L) em função de de E (%)versus t(h)

As Figuras 27 e 28 com efeitos na resposta Y1 dos fatores substrato e tempo, com a dosagem enzimática fixada no ponto central, demonstra sobre a resposta produtividade de AR que as dosagem de enzima maiores que <0,87µL reduzem o tempo de hidrólise nível 0 (26h) de tempo.

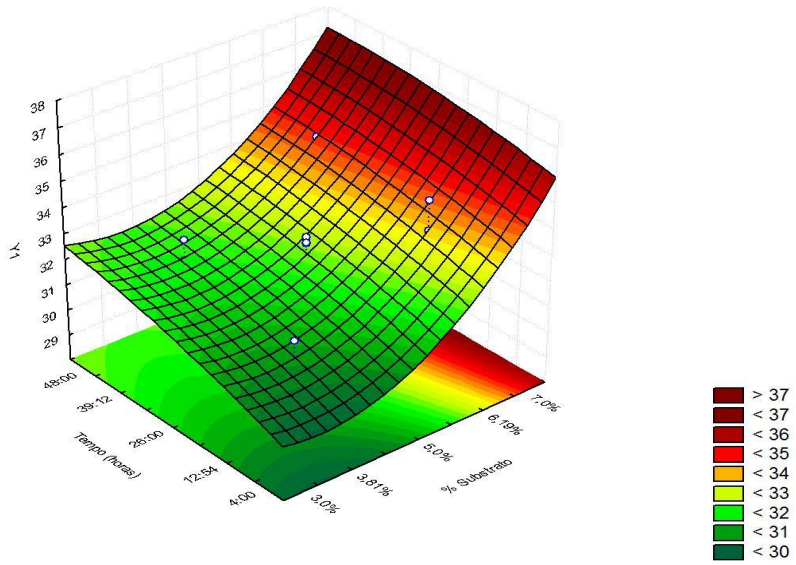


Figura 27 – Superfície de resposta para a resposta Y1 (g/L) em função de S(%) versus t(h)

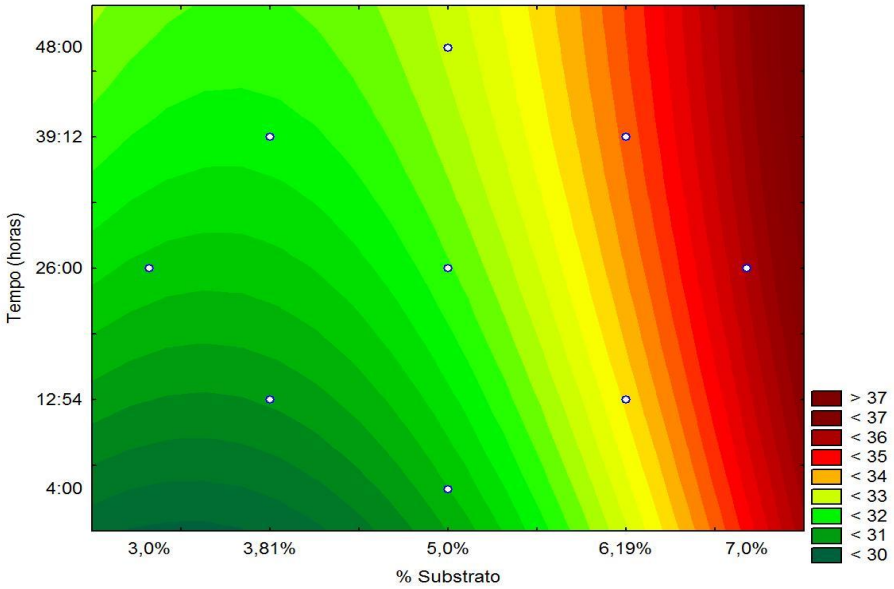


Figura 28 – Curva de contorno para a resposta Y1 em função de S(%) versus t(h)

4.5. Eficiência de hidrólise

Os valores da porcentagem de eficiência resultantes dos 20 experimentos, descritos na Tabela 16 se observa que as eficiências mínima e máxima e dos ensaios foram de 61,98 e 125,89%, respectivamente, o que corresponde a um valor médio de 93,93%. As hidrólises foram calculadas em razão da resposta Y1, conforme equações 6 e 7.

Na Tabela 18, que apresenta os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para a resposta eficiência de hidrólise (Y2), averigua-se que o modelo pode ser empregado para fins preditivos, uma vez que o mesmo proporcionou um coeficiente de correlação de 0,9949. O teste F também mostra que o valor de $F_{calculado}$ é mais do que 72 vezes o valor de $F_{tabelado}$, com 95% de confiança, mostrando que o modelo foi bem ajustado para este fator, logo estatisticamente significativo.

Tabela 18 – Análise de variância do modelo ajustado para a resposta Y2 (eficiência de hidrólise)

Fonte de variação	**Soma quadrática**	**Grau de liberdade**	**Média quadrática**	**Teste F**	**p**
Regressão	4919,5842	9	546,62047	218,339	$2,8.10^{-10}$
Resíduos	25,03544	10	2,50354	-	-
Total	4941,8948	19	-	-	-

$F_{tab\ (9,10)}$ = 3,02 Fonte: Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010).

A figura 29 apresenta os valores observados experimentalmente versus os valores previstos pelos modelos para a resposta Y2, observando-se uma boa concordância entre eles como era se esperar pelo resultado das análises de variância.

Observa-se que os erros de ajustamento independentes e normalmente distribuídos em torno da reta. O Diagrama de Pareto (Fig.30) mostra a importância estatística de cada termo, indicando que o teor de substrato é o fator mais importante.

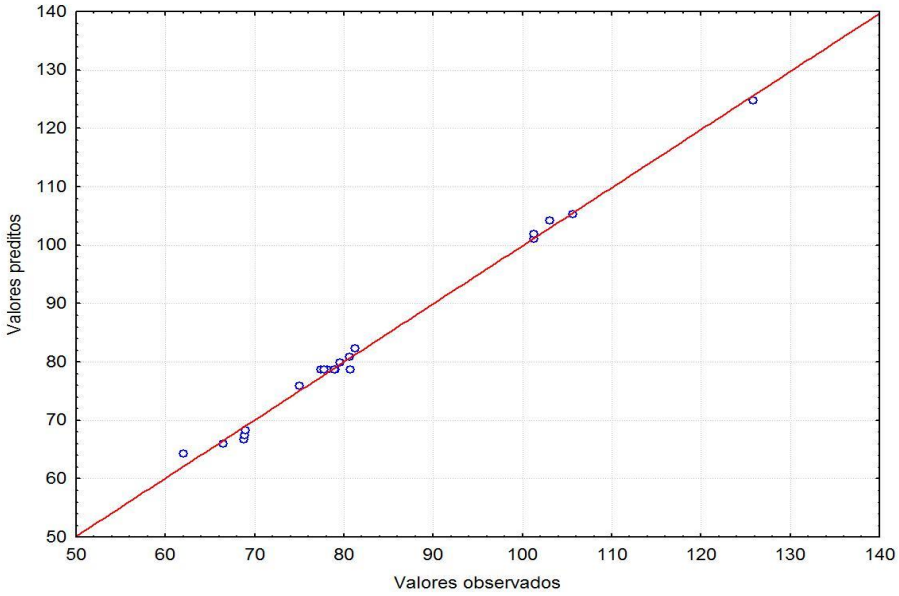


Figura 29 – Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta Y2

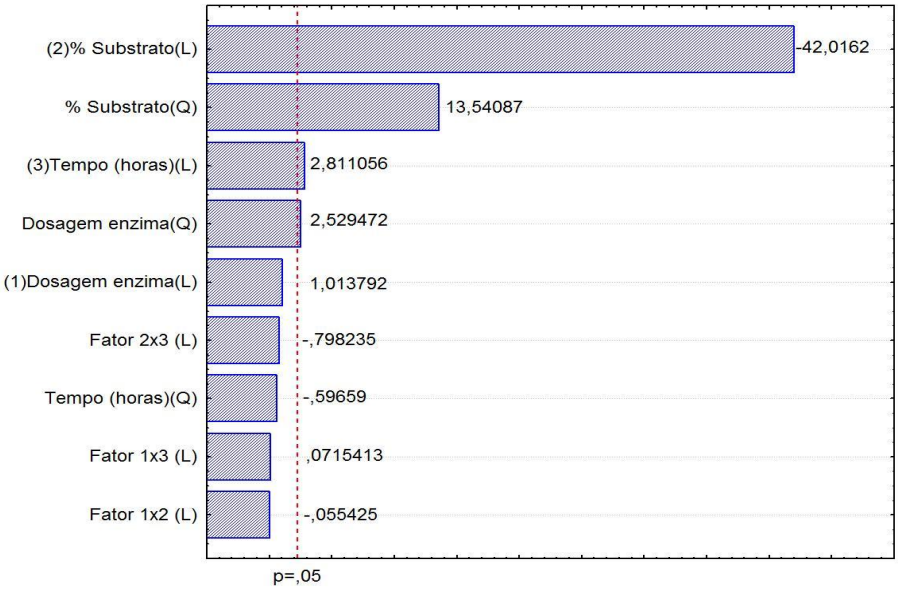


Figura 30 – Diagrama de Pareto para a resposta Y2

A Figura 31 e 32 demonstra os efeitos do (S) e (E) na eficiência, estando o tempo fixado em 26h (ponto central). Observa-se que se fixando o nível de substrato em -1,68 (3%) e quantidade de enzima não apresentam efeito na eficiência, levando a pressupor que uma saturação de enzima em meio com pouco substrato eleva a ação da enzima em cindir o amido em glicose, sendo este valor de saturação para quantidade <0,36µL.

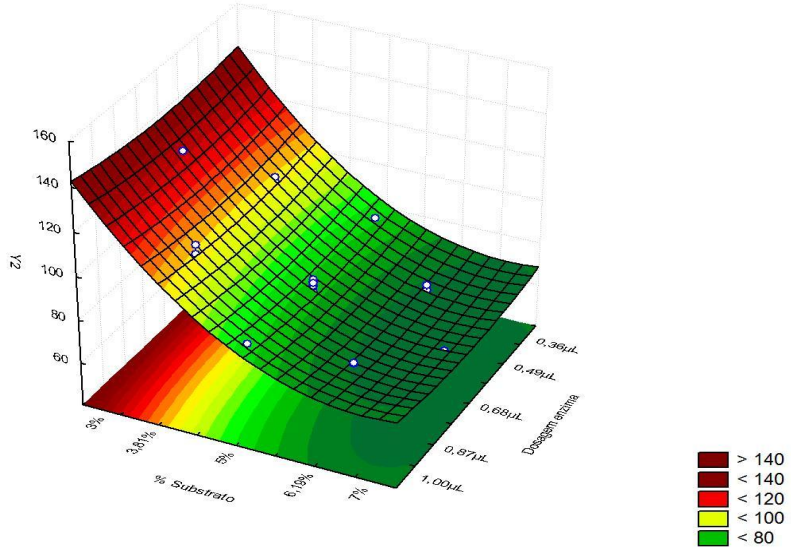


Figura 31 – Superfície de resposta para a resposta Y2 (%) em função de S(%) versus E(µL)

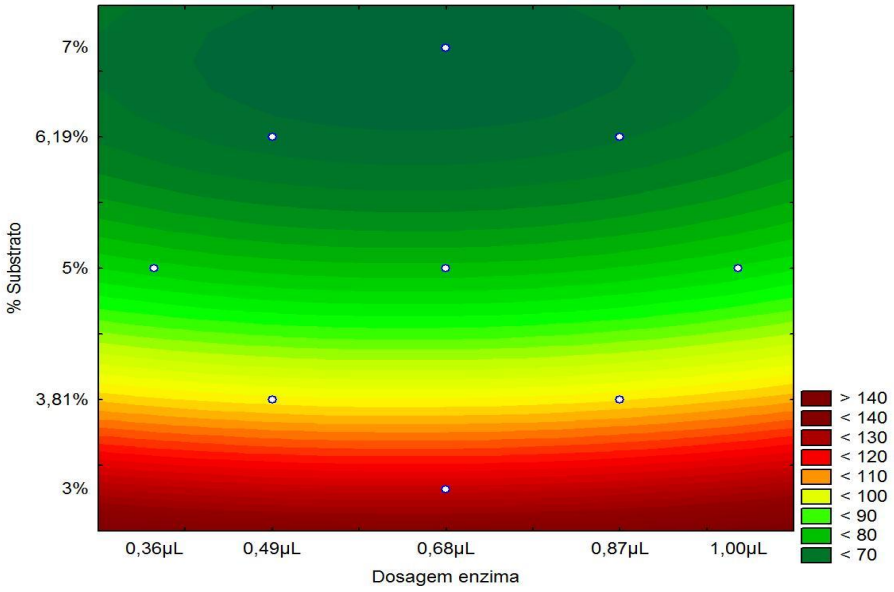


Figura 32 – Curva de contorno para a resposta Y2 (%) em função de S(%) versus E(µL)

As Figuras 33 e 34 apresenta os efeitos na resposta Y2 dos fatores (E) e (t), com (S) fixado no ponto central, demonstra que para valores acima de 82% para Y2 serão no tempo < que nível 0 (↑26 horas) e E < que o nível +1 (↑0,87 µL).

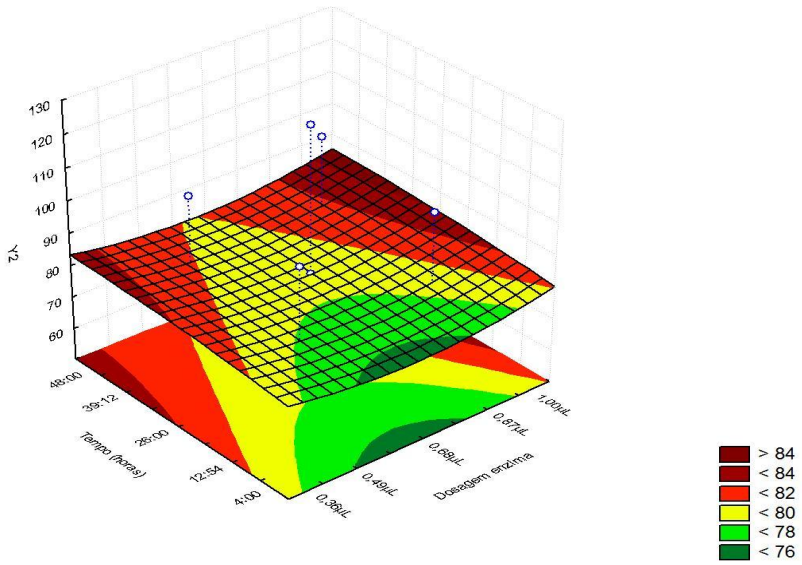


Figura 33 – Superfície de resposta para a resposta Y2 (%) em função de E(µL) versus t(h)

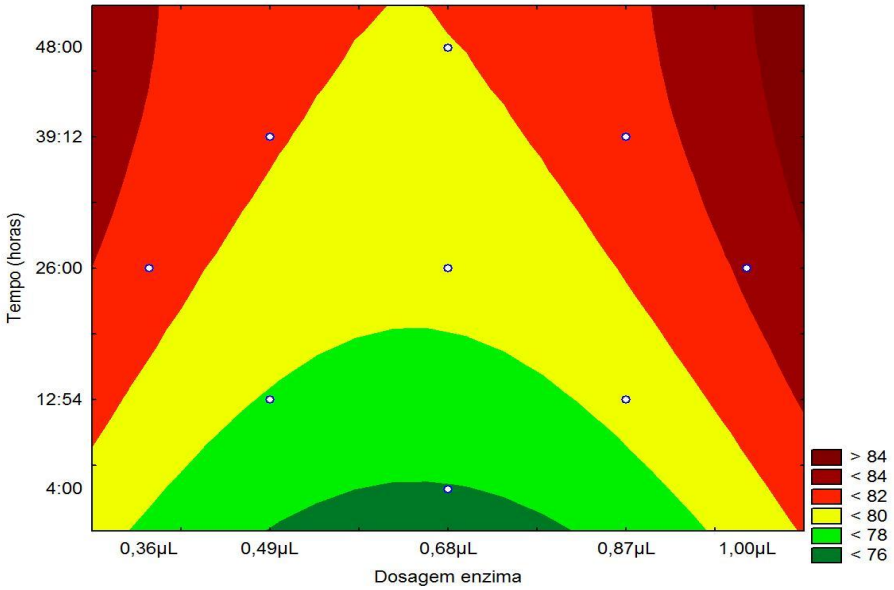


Figura 34 – Curva de contorno para a resposta Y2 (%) em em função de E(µL) versus t(h)

As Figuras 35 e 36 apresenta os efeitos na resposta Y2 dos fatores (S) e (t), com (E) fixado no ponto central, demonstra que para valores acima de 110% para Y2 serão no tempo < que nível 0 (↓26 horas) e S < que o nível -1 (↓3,81%).

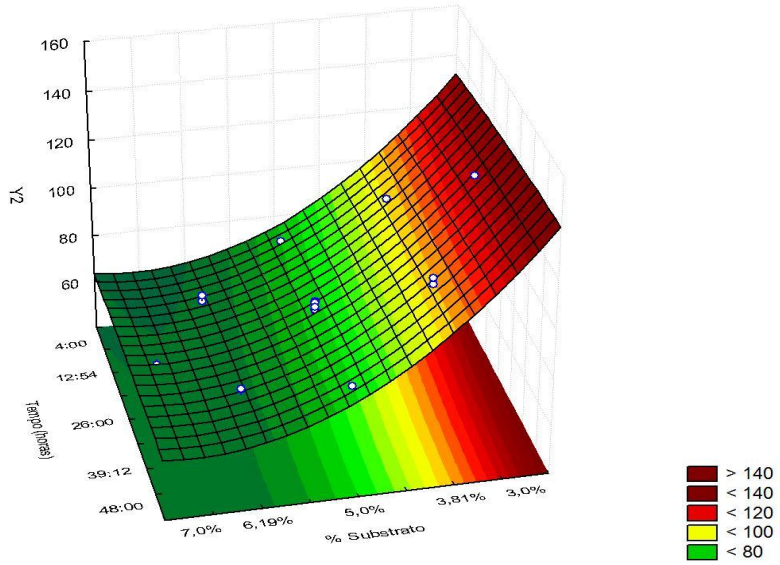


Figura 35 – Superfície de resposta para a resposta Y2 (%) em função de S(%) versus t(h)

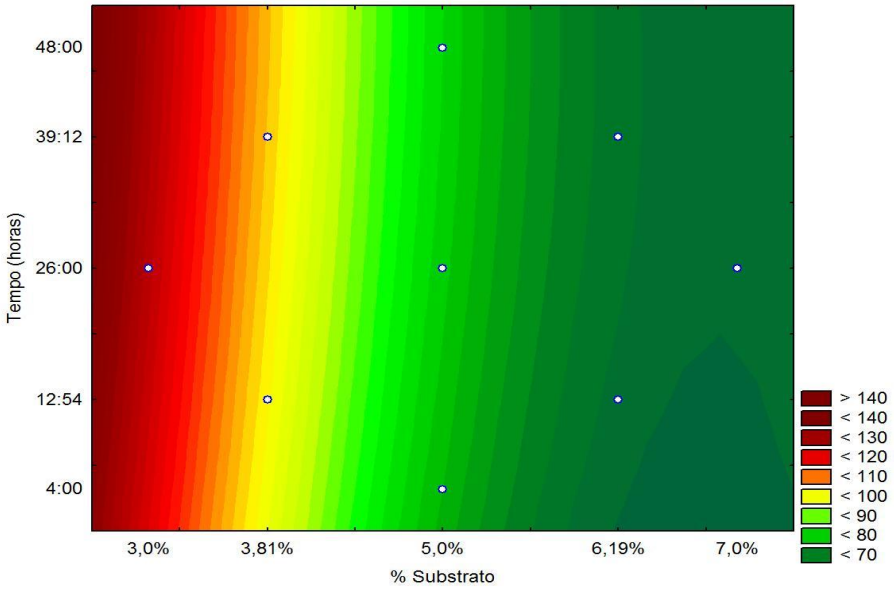


Figura 36 – Curva de contorno para a resposta Y2 (%)em função de S(%) versus t(h)

Uma conversão deve dar um rendimento em AR igual ou próximo ao teórico. Operacionalmente, a hidrólise por meio de enzimas dextrinizantes e sacarificantes possibilita um rendimento de aproximadamente 96% da glicose teoricamente possível a partir do amido da matéria-prima, por quaisquer dos processos descritos na literatura.

4.6. Efeitos dos fatores (enzima, substrato e tempo) sobre as respostas

4.6.1. Efeitos do fator enzima sobre a hidrólise enzimática

O amido no substrato de batata foi hidrolisado para essas diferentes concentrações de substrato, nestas dosagens de enzimas. Quando a dosagem de enzimas aumentou na faixa de 0,47 a 0,68 microlitros de AMG por grama de amido na MS, a produção de glicose no substrato não foi sofreu um acréscimo. A hidrólise com diferentes doses de enzimas mostra uma diferença significativa para o substrato.

Com uma quantia fixa de enzima, a hidrólise enzimática foi maior com menos substrato disponível. Apesar de apresentar atividade amilolítica padronizada, AMG apresentou resultados mais elevados no nível médio (ponto central) do que quando usada em um nível superior. Isso talvez explicado devido a uma maior afinidade da enzima com a saturação própria no meio do que com a concentração de substrato.

Estes resultados indicam que a concentração acima de 0,68 da dosagem de enzima não resulta em acréscimo de rendimento e deva saturar os grânulos de amido com as moléculas de enzima ativa. Conforme explica Apar e Ozbek (2003), isso pode ser devido a algum tipo de inibição enzima-enzima que reduz a capacidade dos sítios ativos para ligar eficazmente para as partículas de amido.

Quantidades crescentes de AMG exercem influência bastante acentuada na velocidade da conversão, o decréscimo, reside na inibição exercida por quantidades crescentes de glicose, formadas durante o processo e conjuntamente à diminuição gradual de amido no meio. À medida que acumula glicose no meio, tem lugar o efeito repressivo, também chamado “efeito glicose” (REGULY, 1996) ou também chamada na enzimologia de repressão catalítica.

A partir deste estudo, a dosagem de enzima necessária para incremento nas respostas Y1 e Y2 se estabelece sendo de $0,47 < E > 0,68 \mu L$.

4.6.2. Efeito do fator substrato sobre a hidrólise enzimática

Neste estudo, o efeito da concentração de substrato na hidrólise foi significativo, quanto à dosagem. Entretanto, a hidrólise enzimática no amido de batata, com a concentração de substrato diferente também varia quando diminui a dosagem de enzimas. Aumentar o substrato proporcionou uma menor velocidade de hidrólise enzimática em uma dose mais baixa de enzima.

Como mostrado na tabela 16 as maiores concentrações de substrato (6,19 e 7,0%) foram as que forneceram maiores rendimentos de hidrólise para todos os ensaios, sendo que se obteve uma eficiência e AR produzidos com valores médios de 33,11g e 83,04% respectivamente. Pode-se notar também que o aumento da porcentagem de substrato no meio representou aumentos relevantes no rendimento de hidrólise nos ensaios, este aumento foi bastante considerável.

De acordo com a análise dos dados, a interação tipo de Tempo *versus* Concentração foi significativa, ou seja, o rendimento de hidrólise não depende de um fator independente, mas sim da combinação entre eles.

Segundo Aehle (2007), as taxas de hidrólise aumentam com crescente comprimento da cadeia do substrato, mas dado tempo suficiente e suficientemente baixas as concentrações de sólidos dissolvidos, a AMG converterá completamente os oligossacarídeos à glicose. Este fato evidencia que a baixa concentração de substrato influenciara positivamente a hidrólise permitindo melhor interação da enzima com substrato alvo.

Com este estudo, a percentagem de substrato necessário para desdobramento positivo nas respostas Y1 e Y2 se estabelece no ponto central (5%).

4.6.3. Efeito do fator tempo sobre a hidrólise enzimática

Em relação fator tempo, não observa um efeito significativo, sendo que após o período a hidrólise tende ser constante após 26 horas. Estes resultados podem ser mascarados pelo fator em questão, já que foi utilizada a concentração final de AR para o cálculo de rendimento.

Sendo assim em tempos de níveis menores (4 horas) se poderia ter finalizado a reação e em níveis maiores (48 horas) não seria percebida este efeito, já que a tendência seria estabilização ou até decréscimo AR no meio seja por contaminação biológica favorecida pela temperatura e o AR no meio ou mesmo inibição pelos produtos no meio ou transformações dos produtos em outros compostos. Isto levaria tornar o variável tempo como significativa, sendo que não ocorreria na prática.

Segundo Cereda *et al*. (2004) consideram o tempo de 4 horas como suficiente para completa sacarificação do amido purificado em várias enzima comerciais. Em experimento semelhante ao executado por A. Pandey *et al*. (2000), utilizando bagaço de mandioca obtiveram melhores os resultados com 24 horas da ação da enzima.

O período de 26 horas seria então plenamente suficiente para quebra do amido no substrato de batata.

4.7. Otimização das variáveis independentes pela função desejabilidade

A estimativa das condições ótimas para a hidrólise do amido no substrato foi realizada com base nos modelos estatísticos propostos e com o auxílio da técnica de otimização simultânea denominada "Função Desejabilidade". Na Tabela 19 resume a programação estabelecida no *software Statistica*® para a entrada dos valores numéricos necessários à otimização do processo de hidrólise. São especificados os valores numéricos limites e expoentes (Tabela 19) que determinam a importância da função para encontrar o valor médio desejado.

Tabela 19 – Parâmetros utilizados na otimização das respostas do processo de hidrólise

Respostas	**LI**	**D**	**M**	**D**	**LS**	**D**	**s Param.**	**t Param.**
Y1	30,71780	0,0	33,13420	0,5	35,5505	1,0	1,0	1,0
Y2	61,98568	0,0	93,93957	0,5	125,8934	1,0	1,0	1,0

Limite mínimo (LI), o valor mediano (M) e o limite superior (LS), expoentes s e t.

Na tabela 20 observamos os valores preditos para resposta Y1 e Y2 e seus níveis de confiança de ±95% para as mesmas, nos ensaios experimentais.

Tabela 20 – Respostas previstas para cada nível de cada fator mantendo todos os outros fatores constantes em sua configuração atual

Fator	Nível do fator	Ŷ1	Ŷ2	Valor de D	-95% CI Ŷ2	+95% CI Ŷ1	-95% CI Ŷ1	+95% CI Ŷ2
E	-1,68	33,17291	128,6256	0,712748	31,01104	35,33478	122,5556	134,6955
E	-0,84	32,22711	126,8325	0,558842	30,73729	33,71692	122,6495	131,0155
E	0,00	31,94281	126,5295	0,503467	30,66999	33,21563	122,9558	130,1033
E	0,84	32,32003	127,7167	0,575788	30,83021	33,80985	123,5337	131,8997
E	1,68	33,35876	130,3941	0,739235	31,19689	35,52063	124,3242	136,4641
S	-1,68	33,17291	128,6256	0,712748	31,01104	35,33478	122,5556	134,6955
S	-0,84	33,08924	101,2105	0,548795	31,59942	34,57906	97,0275	105,3935
S	0,00	33,70653	81,7727	0,437581	32,43371	34,97936	78,1989	85,3464
S	0,84	35,02479	70,3121	0,340756	33,53497	36,51460	66,1291	74,4951
S	1,68	37,04400	66,8288	0,275286	34,88213	39,20587	60,7588	72,8987
t	-1,68	31,26635	123,1144	0,329500	28,51470	34,01800	115,3885	130,8403
t	-0,84	31,96572	125,2267	0,505495	29,89837	34,03307	119,4221	131,0313
t	0,00	32,57215	126,9876	0,619436	30,73006	34,41424	121,8155	132,1596
t	0,84	33,08564	128,3970	0,699966	31,01829	35,15299	122,5924	134,2015
t	1,68	33,50619	129,4549	0,759589	30,75455	36,25784	121,7290	137,1808

(CI) Coeficiente de indicador de confiança; (Ŷ) Valor predito.

Os perfis de desejabilidade são apresentados a obtidos via função estatística do *software Statistica* denominada “Perfis para Valores Preditos e Desejabilidade” (Figura 37) representa o digrama da Função Desejabilidade para a descrição das condições otimizadas na hidrólise, dentro das faixas de valores estabelecidas nos ensaios experimentais.

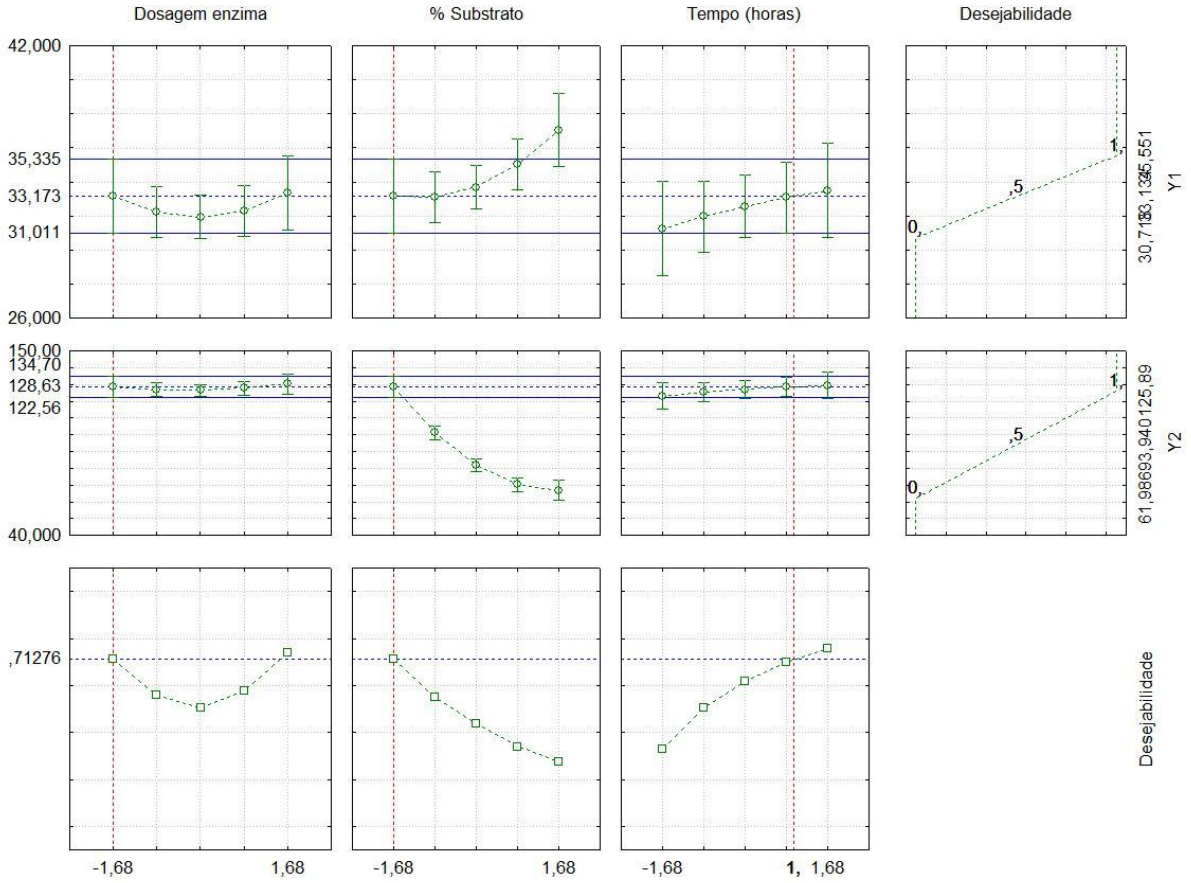


Figura 37 – Perfis dos valores preditos e Desejabilidade para as respostas Y1 e Y2 respectivamente

Dois grupos de gráficos podem ser observados. Nos localizados acima se deparam os valores desejáveis para os três fatores de interesse considerando o limite de confiança referente ao valor ótimo.

No segundo grupo, apresentam-se só as tendências reveladas pelos fatores onde a linha azul tracejada representa o valor ótimo. Os gráficos correspondentes indicam que no caso da dosagem enzimática de AMG, concentração de substrato e tempo de reação, o intercepto da linha pespontada com o máximo do gráfico demonstra claramente seus valores ótimos, a qual corresponde aos valores de: 0,36µL de AMG por grama de MS (nível -1,68), 3% de substrato no meio (nível -1,68) e 39 horas e 6 minutos de tempo reacional após aplicação da AMG (nível +1).

Os gráficos da última coluna mostram os perfis das desejabilidade das duas respostas, definidas de acordo com os valores escolhidos para os limites e os expoentes na Tabela 19. As linhas tracejadas verticais (em vermelho) sinalizam as condições de máxima desejabilidade global, que para o processo de hidrólise, alcançou 0,7125, como pode ser visualizado na última linha de gráficos da Figura 37.

A razão entre substrato/água utilizada na escala laboratorial para a produção de AR e resposta Eficiência ficou estabelecida na etapa de otimização, foi 3% de substrato (m/v); 0,36 (µL/g MS) de dosagem enzimática e tempo de permanência de 39 horas e 6 minutos.

4.8. Efeito da duração da etapa de sacarificação

As figuras 38, 39, 40 e 41, indicam os resultados obtidos com a hidrólise desde o início da etapa de sacarificação, ou seja, a contar do momento da dosagem de AMG e seu tempo de permanência no meio.

No início da sacarificação, a alta concentração do polissacarídio induz a catalise da enzima em taxa crescente. O decréscimo, bastante pronunciado, desta velocidade, a partir de aproximadamente quatro horas de sacarificação, reside na inibição exercida por quantidades crescentes de glicose, tem lugar o efeito inibitório, também chamado "efeito glicose" ou que consiste na repressão da síntese de glicose (REGULY, 1996).

Segundo Aehle, (2007) a etapa de sacarificação é realizada em cerca de 48 horas com 27-30% de sólidos e é interrompida quando a concentração de glicose atinge seu maior valor em cerca de 96% do total teor de açúcar.

Esse mecanismo de indução-repressão é próprio do sistema enzimático e é observado dentro da enzimologia sendo chamada de repressão catalítica, quando grandes quantidades de substrato ou produtos são conhecidas por inibir a biocatálise de reações. Este efeito inibitório da ação da enzima pelos seus produtos só seria solucionada com a adoção do processo de sacarificação contínua, com retirada da glicose na medida em que se acumula o que só é possível pelo uso de enzimas imobilizadas.

Outro fato que se explica redução AR no meio é o risco de contaminações bacterianas formadas durante o processo, paralelamente à diminuição gradual da concentração de AR. A contaminação microbiana que pode ocorrer durante a sacarificação. Dependendo do tipo de hidrolisado produzido e conseqüentemente da enzima de sacarificação usada, a temperatura para essa etapa varia entre 55 e 65°C, temperatura na qual pode ocorrer desenvolvimento de microrganismos e particularmente de leveduras (SURMELY *et al*., 2003, p.440).

As reações de hidrólise de oligossacarídeos são reversíveis e em altas concentrações de glicose, pode levar a uma composição de equilíbrio com um determinado conteúdo predominantemente de maltooligossacarídeos (POLAKOVIČ e BRYJAK, 2003).

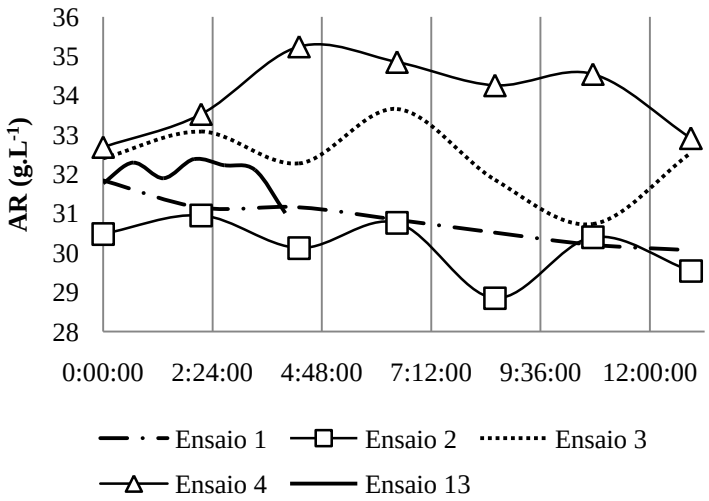


Figura 38 – Gráfico do tempo versus liberação de AR (Ensaios > de 13 horas)

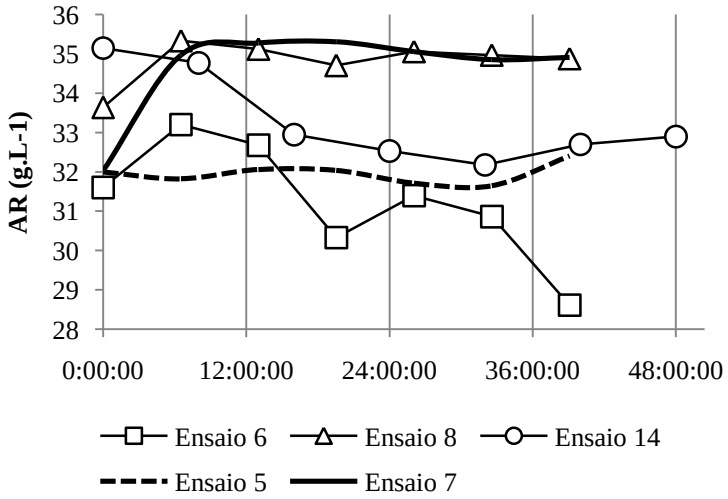


Figura 39 – Gráfico do tempo versus liberação de AR (Ensaios < 39 horas)

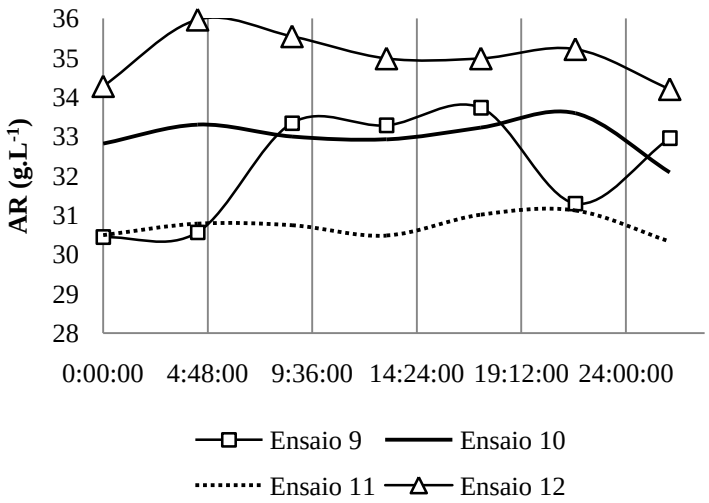


Figura 40 – Gráfico de tempo versus liberação de AR (Ensaios de 26 horas)

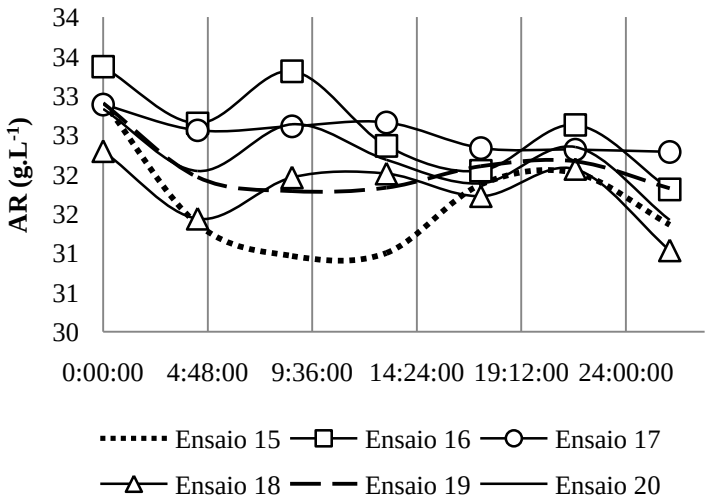


Figura 41 – Gráfico de tempo versus liberação de AR (Ensaios de 26 horas)

Uma possibilidade para contornar problema com inibição seria na utilização da fase de sacarificação e fermentação (quando produto final é o álcool) em conjunto. Conforme Ahring & Westermann (2007), a etapa de hidrólise é otimizada realizando o tratamento enzimático juntos com a fermentação de leveduras de glicose (sacarificação simultânea a fermentação, SSF). A temperatura ótima das enzimas, no entanto, muitas vezes maior do que o ótimo para o fermento. Isso pode deprimir as vantagens de SSF relação à aos dois processos separados.

5 CONCLUSÃO

O processo experimental em bioretor e banho metabólico utilizados neste trabalho de dissertação, associado às condições experimentais estabelecidas para analisar o processo de hidrólise do substrato de batata dessecado, propiciou a quebra do amido em glicose com eficiência acima de 62%, possibilitando o emprego desta matéria-prima para o desenvolvimento de hidrolisados

Diante dos resultados apresentados e discutidos anteriormente, a respeito da caracterização e do processo de hidrólise enzimática em leito bioreator com enzimas livres, ainda podem ser sumarizados as seguintes conclusões:

- A composição centesimal (umidade, proteína, resíduo mineral, lipídios e carboidratos) dos flocos moídos e dessecados de batata inglesa, atesta com uma grande fonte de amido, possibilitaram também classificá-las como material de alto teor amiláceo e sem muita variação após processamento industrial o que pode favorecer o processamento desta matéria prima de forma dessecada;
- A máxima eficiência de hidrólise foi conseguida no ensaio 11, com 125,89% com seguintes parâmetros: 3% de substrato seco, dosagem de 0,87µL, tempo reacional de 26 horas. Seu teor final de AR foi de 30,94 g/L.
- O maior teor de AR foi encontrado no ensaio 12, com parâmetros de quantidade de enzima e tempo iguais ao item anterior, e 7% de substrato (nível máximo estabelecido), demonstrando influência desta variável nesta resposta.
- O exame das variáveis do processo indicou que o período de hidrólise e dosagem de enzima exerceu menor influência na eficiência e no teor de AR, sendo que com o aumento do substrato aumentam os valores de AR e sua diminuição aumenta a porcentagem de eficiência.
- O rendimento médio obtido foi de 94%, demonstrando que este processo é uma alternativa viável à indústria despontando este material como promissor;
- Verificou-se que os modelos que descrevem as respostas Açúcar Redutor liberado e Eficiência de hidrólise, em função das variáveis estudadas, foram estatisticamente

significativos, visto que a variação explicada pelos modelos foi de 91,28% e 99,49%, respectivamente, e os F calculados altamente significativos ($p<0,001$).

- Com base no estudo das superfícies de resposta, pode-se predizer que nas condições de: 0,68µl de enzima AMG e 3% de substrato, observa-se o menor tempo de hidrólise, que é de 26 horas;
- Com o uso da função desejabilidade, priorizando redução gasto com enzima, podemos predizer que nas condições de: 0,36µl de dosagem de enzima AMG, 3% de substrato e tempo reacional após aplicação da AMG em 39 horas e 6 minutos obtendo-se valores preditos de 33,17g/L de AR e eficiência da ordem de 128,62% .

5.1. Perspectivas para novas pesquisas

Para dar continuidade ao estudo do processo de hidrolise-sacarificação, envolvendo o processamento de matérias primas como a batata, sugere-se:

- Avaliar a qualidade do processo com formas in-natura de batata e resíduos do processamento da mesma;
- Estudar o uso de sacarificação simultânea a fermentação, e avaliar experimentalmente faixas de tempos diferenciados;
- Analisar a eficiência energética do processo de hidrólise de batata-inglesa nas suas diferentes formas;
- Instalar um sistema de aquisição de dados visando monitorar o processo de hidrólise, buscando maior precisão, rapidez e agilidade na obtenção dos resultados experimentais;
- Traça um perfil dos tipos de açucares (mono, oligo e polissacarídeos) obtidos pela hidrólise enzimática por cromatografia ou outros métodos de alto desempenho;
- Estudar o efeito da interação da razão substrato-enzima na eficiência do processo de hidrólise;
- Estudar uso de enzimas complementares (proteases, celulases) e de diferentes origens (vegetal, bacteriana e fúngica) e fabricantes, afim de avaliação.
- Fazer uso de enzimas de forma imobilizadas;
- A partir das informações do processo de hidrólise obtidas neste trabalho, estudar o processo em unidades de maior escala, visando o aproveitamento da matéria prima em níveis comerciais e industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSAR, Nurul; ZAIDUL, I.S.M.; TAKIGAWA, Shigenobu; HASHIMOTO, Naoto, MATSUURA-ENDO, Chie; YAMAUCHI, Hiroaki; NODA, Takahiro. Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of phosphorus. Food Chemistry, Japan, Volume 112, Issue 1, p. 57-62. 01 jan. 2009

A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis of AOAC International / 18th ed. Maryland : AOAC International, 2005. ca 1750 p. :

AEHLE, Wolfgang. Enzymes in Industry: Production and Applications. 3.ed. Darmstadt: Wiley-vch, 2007. 516p.

AGUSTINI, D., ZANELA, J., Zorel H.E.J, CUNHA, M.A.A. Hidrólise enzimática natural do amido de mandioca para a produção de açúcares fermentescíveis. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). Nov, 2008.

AKHANAZAROVA S; KAFAROV V. Experiment Optimization in Chemistry and Chemical Engineering, Mir Publishers, Moscow. 1982.

AMYLOSE2.SVG. Altura: 486 pixels. Largura: 188 pixels. True Color 24 bits. 47 Kb. Formato SGV. In: Amylose - Wikimedia Foundation, Inc. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Amylose2.svg>. Acesso em 20 de abr 2011.

AMYLOPEKTIN_SESSEL.SVG. Altura: 451 pixels. Largura: 359 pixels. True Color 24 bits. 42 Kb. Formato SGV. In: Amylopectin - Wikimedia Foundation, Inc. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Amylopektin_Sessel.svg>. Acesso em 20 de abr 2011.

AGUIRRE, José Maurício de; GASPARINO FILHO, José. Desidratação de frutas e hortaliças: Manual técnico. Campinas: ITAL, 2002. 205 p.

AHRING, Birgitte; WESTERMANN, Peter. Coproduction of Bioethanol with other Biofuels. In: OLSSON, Lisbeth (Ed.). Biofuels. Berlin: Springer, 2007. 4.cap.296p. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).

APAR, Dilek Kılıç; ÖZBEK, Belma. σ-Amylase inactivation during corn starch hydrolysis process. Process Biochemistry, Esenler/Istanbul, v.39, n.12, p.1877-1892, 16 set. 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-4B22XSC-3/2/208005ccaeefcfd08469ae0a34a80926>. Acesso em: 10 dez. 2010.

ARTEAGA, G.E. et al. Systematic experimental designs for product formula optimization. Trends in Food Science and Technology, Cambrigde, v.5, n.8, p.243-254, aug. 1994.

BALAT, Mustafa; BALAT, Havva; ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science, Turkey, p. 551-573. 28 jan. 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4.ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. p.285-298.

BELITZ, Hans-dieter. Food Chemistry. In: BELITZ, Hans-dieter; SCHIEBERLE, Peter; GROSCH, W.. Food Chemistry: Enzymes. 4. ed. Berlin: Springer-verlag, 2009. Cap. 2, p. 93-155.

BERMUDEZ, J.J.H. Valorización de las amiláceas “no-cereales” cultivadas en los países andinos: Estudio de las propriedades fisicoquímicas y funcionales de sus almidones y de la resistência a diferentes tratamientos estresantes. Colombia: Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Bogotá, 1997. 150p. (Trabajo de Grado)

BERTOFT, Eric; BLENNOW, Andreas. Structure of Potato Starch. In: SINGH, Jaspreet; KAUR, Lovedeep (Ed.). Advances in Potato Chemistry and Technology. New York: Elvesier, 2009. cap.4, p. 83-94.

BRADSHAW, John E.; RAMSAY, Gavin. Potato Origin and Production. In: SINGH, Jaspreet; KAUR, Lovedeep (Ed.). Advances in Potato Chemistry and Technology. New York: Elvesier, 2009. Cap. 1, p. 1-7.

BRASIL, Resolução n.º 12, de 1978. Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos – CNNPA/ANVISA – Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Normas técnicas especiais. São Paulo, 1978. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/ resol/12_78.pdf . Acesso em 10 jan. 2011.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Fascículo 1 (Amido). 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/ farmacopeia/farmacopeia.htm> Acesso em: 10 janeiro de 2011.

BRENDA Database: The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org/>. Acesso em: 20 abr. 2011.

BOBBIO, Paulo A.; BOBBIO, Florinda Orsatti. Química do processamento de alimentos: Enzimas. 3.ed. São Paulo: Varela, 2001. Cap.3, p.143-167.

BURTON, W. G. (1989), (Third edition). The Potato. Longman Scientific & Technical, Harlow.

CAETANO, N. N.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M. Apostila de Farmacognosia I Prática (Amidos). 1995. Disponível em: <http://sbfgnosia.org.br/Ensino/amido.html> Acesso em 20 fev. 2011.

CEREDA, M. P.; CATÂNEO, A. Avaliação de parâmetros de qualidade da fécula fermentada de mandioca. Revista Brasileira de Mandioca, Cruz das Almas, v.5, n.2, p.55–62, 1986.

CEREDA, Marney Pascoli; VILPOUX, Olivier Francois (Coord.). Propriedades gerais do amido. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. v.1, cap.6, p.530-575 (Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas).

CARVALHO, Raquel Vieira de, et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico Bacillus sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2008, vol.28, n.2, p.380-386.

CONNER, Anthony J. et al. Developments in transgenic biology. In: VREUGDENHIL, Dick et al. (Ed.). Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives: Field-Testing of Transgenic Potatoes. Amsterdam: Elsevier Science, 2007. Cap. 31, p. 687-701.

COSTA, Cristiane Maria Leal. Caracterização e análise experimental do recobrimento de sementes de jambu (Spilanthes oleracea) em leito fluidizado. 2010. 182f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

CURVELO-SANTANA, José Carlos; EHRHARDT, Daniela Diniz and TAMBOURGI, Elias Basile. Otimização da produção de álcool de mandioca. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2010, vol.30, n.3, p.613-617.

DERRINGER, G; SUICH, R. Simultaneos optimization of several response variables. Journal of Quality Technology, v.12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DOBLE,M.; KRUTHIVENTI,A.K.; GAIKAR,V.G. Biotransformations and bioprocesses. New York: Marcel Dekker, 2004. 371p. (Biotechnology and Bioprocessing Series).

FAO. Food and Agriculture Organization. Production yearbook. Roma: FAO, 1986. 306p.

FIOREZE C. 2005. Transição agroecológica em sistemas de produção de batata. Santa Maria: UFSM. 117p (Tese mestrado).

FREITAS, A. A. de; KWIATKOWSKI, A.; TANAMATI, A. A. C.; FUCHS, R. H. B. Uso de farinhas de batata inglesa (Solanum tuberosum L.), cv Monalisa em misturas para cobertura de empanados de frango. Ciências Exatas Terra, Ciências Agrícolas e Engenharia, Ponta grossa, v.11, n.2, p.17-26, 2005.

GOULD, Barry J. Enzyme Biotechnology, Chichester, A. Wiseman Ed. Ellis Horwood Ltda. Publ. 1975.

HASHEM, Mohamed; DARWISH, Soumia M.I. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by Saccharomyces cerevisiae. Biomass & Bioenergy, Saudi Arabia, p.953-959. 05 mar. 2010.

HUBBARD, Merton R. Statistical quality control for the food industry: Design of Experiments. 3.ed. New York: Kluwer Academic, 2003. Cap.12, p.232-252.

HUBER, Kerry C.; MCDONALD, Armando; BeMILLER, James N. Carbohydrate Chemistry. In: HUI, Y.H. (Ed.). Handbook of food science, technology, and engineering: Carbohydrate Chemistry. Boca Raton: CRC Press, 2005. cap.1, p.1-23. (Food Science and Technology).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas - métodos químicos e físicos de análises de alimentos. V. 1, 3a Ed.. São Paulo, SP. 1985.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2007, vol.27, n.3, p.579-588.

LEONEL, M. Processamento de batata: fécula, flocos, produtos de extrusão. In: SEMINÁRIO MINEIRO SOBRE PROCESSAMENTO DE BATATAS, Pouso Alegre, Minas Gerais. Anais... Pouso Alegre: EPAMIG, 2005. CD

LOPES, Carlos Alberto; BUSO, José Amauri (Org.). A cultura da batata. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1999. 184p. (Coleção Plantar 42).

LÓPEZ, Cristina; TORRADO, Ana; FUCIÑOS, Pablo; GUERRA Nelson P. and PASTRANA, Lorenzo. Enzymatic hydrolysis of chestnut purée: process optimization using mixtures of alpha-amylase and glucoamylase. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, Ourense, (Spain), p.2907-2914. 20 jan. 2005.

LIU, Qiang; DONNER, Elizabeth; TARN, Richard; SINGH, Jaspreet; CHUNG, Hyun-Jung. Advanced Analytical Techniques to Evaluate the Quality of Potato and Potato Starch. In: SINGH, Jaspreet; KAUR, Lovedeep (Ed.). Advances in Potato Chemistry and Technology. New York: Elvesier, 2009. Cap. 8, p. 221-248.

MINTEER, S., Alcoholic Fuels. 1st Edn., CRC Press, USA. 2006. pp: 293.

MILLER, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., v. 31, p. 426.

MUIR, J.G.; O'DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion in vitro. Am J Clin Nutr, v.56, p.123-127, 1992.

MURALIKRISHNA, G; NIRMALA M. Cereal a-amylases - an overview. Carbohydrate Polymers, n.60, 2005. p.163–173.

NESTLE. Profissional: Maggi - Puré de batata. Disponível em: http://www.nestleprofessional.com/brazil/pt/BrandsAndProducts/Brands/Maggi/Pages/Pure_de_Batatas_Bag20Kg.aspx. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.

NIBA, Lorraine. In: HUI, Y.H. (Ed.). Handbook of food science, technology, and engineering: Carbohydrates - Starch. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap.1, p.1-23. (Food Science and Technology).

NODA, T.; TSUDA, S.; MORI, M.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; SAITO, K.; MANGALIKA, W.H.A.; HANAOKA, A.; SUZUKI, Y.; YAMAUCHI, H. The effect of harvest dates on the starch properties of various cultivars. Food Chemistry, Barking, v. 86, n. 1, p. 119-125, 2004.

NUTRIMENTAL. Desidratados: Batata em Flocos. Disponível em: http://www.nutrimental.com.br/fs/smpreparacoes.htm. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.

PARKER , R.; RING, G.S. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. Journal of Cereal Science, Norwich (UK), p.1-17. 20 nov. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2000.0402>. Acesso em: 10 nov. 2010.

PAVEZZI, Fabiana Carina; GOMES, Eleniand SILVA, Roberto da. Production and characterization of glucoamylase from fungus Aspergillus awamori expressed in yeast Saccharomyces cerevisiae using different carbon sources. Braz. J. Microbiol. [online]. 2008, vol.39, n.1, p. 108-114. ISSN 1517-8382.

PASTRANA, L., LÓPEZ. C., TORRADO A., FUCIÑOS P., GUERRA N.P. Enzymatic inhibition and thermal inactivation in the hydrolysis of chestnut purée with an amylases mixture. Enzyme and Microbial Technology, n.39, 2006. p. 252–258.

PEREIRA A.S et al. Produção de Batata no Rio Grande do Sul. Pelotas: Embrapa Clima Temperado Informação. 2005. Circular. Técnica, 48.

POLAKOVIČ, Milan; BRYJAK, Jolanta. Modelling of potato starch saccharification by an Aspergillus niger glucoamylase. Biochemical Engineering Journal, Bratislava, p.57-63. 03 jun. 2003.

PROZYN BIOSOLUTIONS, (Org.). Ficha técnica de produto: Starmax® TG120/Starmax® GA400. São Paulo, 2009.

REEVE, A. Starch hydrolisis: processes and equipment. In: SCHENK, F.W.; HEBEDA, R.E. Starch hydrolysis product: worldwide technology, production, and applications. New York: New York: VCH Publishers, 1992. p.79-120.

REGULY, Júlio Carlos. Biotecnologia dos processos fermentativos: Matérias-primas Agrícolas, processos e produtos. Pelotas: Universitária/UFPEL, 1996. 1v.330p.

REGULY, Júlio Carlos. Biotecnologia dos processos fermentativos: Fermentações industriais e Biomassa celular. Pelotas: Universitária/UFPEL, 1998. 2v. 215p.

REGULY, Júlio Carlos. Biotecnologia dos processos fermentativos: Produção de enzimas e engenharia das fermentações. Pelotas: Universitária/UFPEL, 2000. 3 v. 205p.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioquinha-salsa (Arracacia xanthorriza). Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.

SANTANA, Nívio Batista. Eficiência de hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol.. 2007. Dissertação de Mestrado – UFV.

SBRT - SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS. Álcool a partir de batata. Cetec, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, Elaborado por OLIVEIRA, J.de 2007. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em: 29 mar. 2007.

SBRT - SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS. Flocos de batata. Cetec, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, Elaborado por CAMPOS, V.M.C. de, 2007. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em: 29 mar. 2007.

SBRT - SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS. Fluxograma do processo de desidratação da batata e uso de aditivos. Cetec, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, Elaborado por ANJOS, C.I. dos. 2007. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em: 29 mar. 2010.

STATSOFT, Inc. (2011). Electronic Statistics Textbook (Electronic Version). Tulsa, StatSoft. Disponível em <http://www.statsoft.com/textbook/>. Acesso em 20 de abr 2011.

SILVA, Gabriel Henrique da. Processo em batelada e contínuo de material amiláceo para a produção de etanol: Boletim Técnico da Petrobrás. 23.ed. Rio de Janeiro, 1980. 49-57p.

SINGH, Jaspreet; KAUR, Lovedeep (Ed.). Advances in Potato Chemistry and Technology: Introduction. New York: Elvesier, 2009. 528 p.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. Journal Biological Chemistry, no 200, p. 145-154, 1990.

SOUTO, Betulia de Morais; QUIRINO, Betania. A Metagenômica na Prospecção de Enzimas para Etanol Celulósico. Embrapa: Imprensa (Artigos 2010), Brasília, 17 fev. 2010. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2010/a-metagenomica-na-prospeccao-de-enzimas-para-etanol-celulosico-1/>. Acesso em: 10 out. 2010.

SURMELY, Rodolphe; ALVAREZ, Hugo; CEREDA, Marney Pascoli. Hidrólise do amido. In: CEREDA, Marney Pascoli; VILPOUX, Olivier Francois (Coord.). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. v.3, cap.15, p.530-575 (Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas).

SUMERLY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. Hidrólise do amido. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino Americana. São Paulo: Fundação Cargill, v.3. 2003

TESTER, Richard F.; KARKALAS, John; QI, Xin. Starch - composition, fine structure and architecture. Journal of Cereal Science, Glasgow (UK), p.151-165. 16 out. 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Alimentos e novas tecnologias na UFRGS/ICTA - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. NITZKE, Julio Alberto in: PETTER, Alessandra G.; LUCCHIN, Gustavo L. C.; MARIA, Silvana M. Santa. Produtos alimentícios vegetais: Purê de batata em flocos, 2003. (Modificada por TELES, Camila;

MELLO, Carla; RAUBER, Fábio). Disponível em: <http://www.ufrgs.br/Alimentus/feira /prhorta/puredebatat>. Acesso em: 16 abr. 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa. MDT: Estrutura e Apresentação de Monografias, Dissertações e Teses. 7.ed. Santa Maria: UFSM, 2010. 72p.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 1986. National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em <http://www.nal.usda.gov/ fnic/foodcomp/search/>. Acessado em janeiro de 2011.

VACLAVIK, V.A.; CHRISTIAN, E.W. Essentials of Food Science: Starches in Food. 3.ed. Texas (US): Springer, 2008. Cap. 4, p. 49-67. (Food Science Text Series).

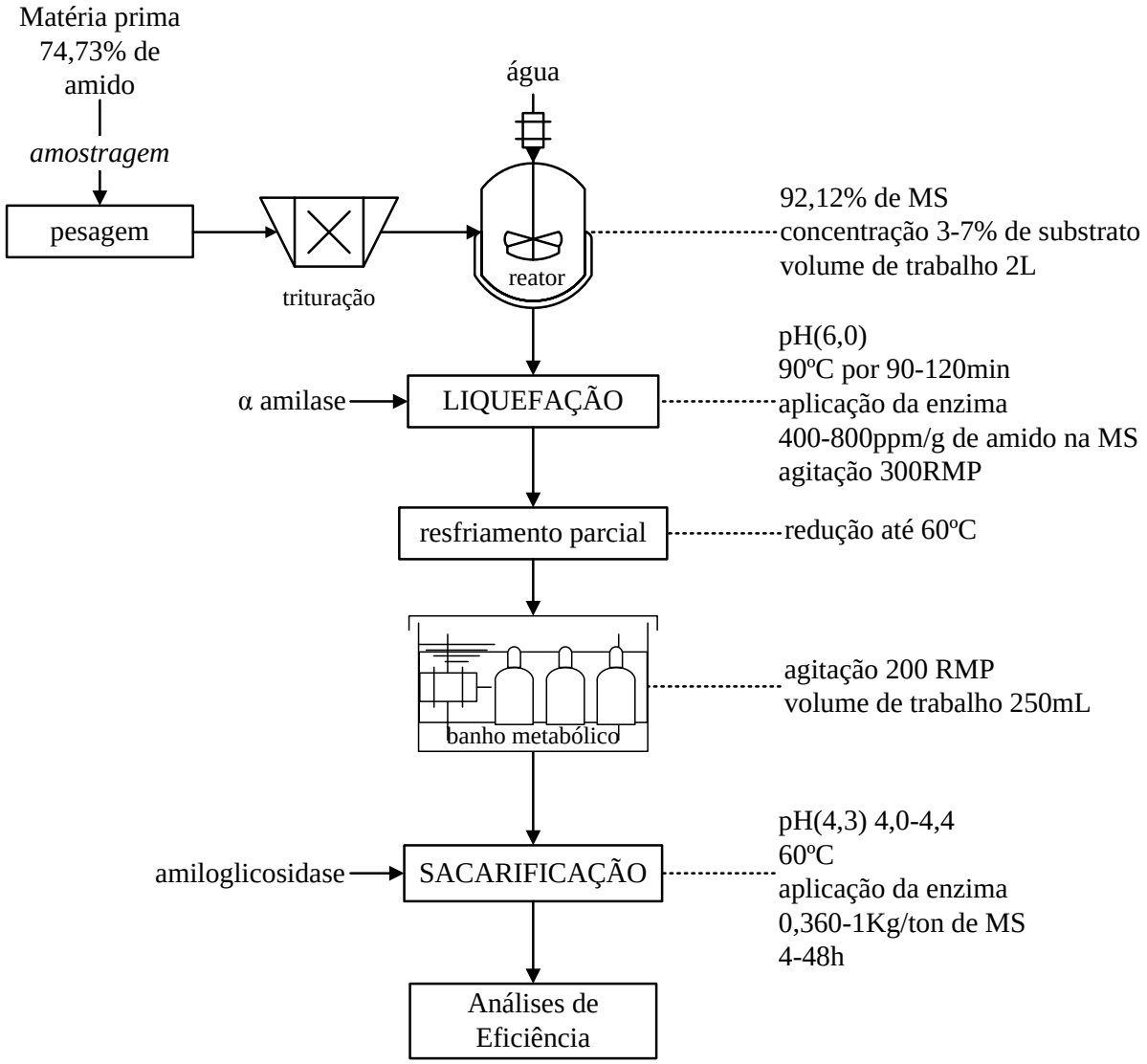
VILLAGRAN, M.D.M-S.; BEVERLY, D.J.; WILLIAMSON, L. Dehydrated potato flakes. US20090098260A1. United States Patent Application, 2009.

ZIEMBA,J.V. Food starches. Types… characteristics, advantages... limitations, applications. Food Eng., Chicago, v.17, f.10, p.71-9, 1965.

YOKI. Semi-prontos: Purê de batata. Disponível em: <http://www.yoki.com.br/ nossas_marcas_2.asp?ac= Categoria&idMarca=1&idCat=17>. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.

WINTECH TAPARIA LIMITED (London, UK). Potato Processing: Potato Flakes. Disponível em: <http://www.wintechtaparia.com/wintech/products-a-application/potato-processing/potato-flakes>. Acesso em: 20 maio 2011.

WALTER, M. Amido Resistente: metodologias de quantificação e resposta biológica em ratos. Santa Maria, 2005, 96p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

ANEXO

Anexo A - Roteiro completo de hidrólise-sacarificação do substrato de batata moída e dessecada com uso de enzimas amilolíticas