

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMIOLÍTICOS PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL

Autor: Manoel Aguiar Neto Filho
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMIOLÍTICOS PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL

Autor: Manoel Aguiar Neto Filho
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Coorientador: Dr. Fábio Henrique Dyzsy

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2017

A282b Aguiar Neto Filho, Manoel
Bioprospecção de fungos amilolíticos para produção de
etanol / Manoel Aguiar Neto Filho; orientador Dr.
Carlos Frederico de Souza Castro; co-orientador Dr. Fábio
Henrique Dyszy. -- Rio Verde, 2017.
63 f.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) -
- Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2017.

1. Etanol. 2. Renovável. 3. Combustível. 4. Fermentação.
I. Castro, Frederico de Souza Castro, Carlos. II. Henrique
Dyszy, Fábio. III. Título.

Cdd:662

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMIOLÍTICOS
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Autor: Manoel Aguiar Neto Filho
Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2017.


Prof.^a Dr.^a Cibele Silva Minafra
Avaliadora externa
IF Goiano/RV


Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo
Baêta
Avaliador externo
UFOP


Prof. Dr. Renato Sérgio Batista
Carvalho
Avaliador externo
Nexsteppe Sementes do Brasil/RV


Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza
Castro
Presidente da banca
IF Goiano/RV

*“Não é sobre chegar no topo do mundo
E saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu
Não é sobre tudo que o seu dinheiro
É capaz de comprar
E sim sobre cada momento
Sorrindo a se compartilhar
Também não é sobre correr
Contra o tempo para ter sempre mais
Porque quando menos se espera
A vida já ficou para trás”*

(Ana Vilela)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve comigo todos os dias, dando força e sabedoria para lidar com as adversidades e superar obstáculos.

Aos meus amados pais, Manoel e Áurea, por sempre me incentivarem nas minhas decisões e compreenderem as minhas inúmeras ausências, tenham a certeza de que sem vocês, nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Frederico de Souza Castro, pela oportunidade, confiança, disponibilidade, dedicação nas correções, revisões, sugestões e principalmente pela amizade.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Fábio Henrique Dyszy pela disponibilidade sempre que necessário.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, que sempre me incentivaram e estiveram comigo, mesmo nos momentos mais difíceis, em especial a Vanessa Paula e Elisângela Borges.

Aos meus amigos, em especial, Karina e Julianna, que estiveram comigo em todos os momentos, incentivando e vivenciando o meu sonho.

A todos os professores que por mim passaram, sem exceção, desde o jardim de infância até aqui, em especial a Professora Doutora Cássia Cristina, hoje uma amiga, que desde a graduação me motivou e me inspira a ser uma pessoa e um profissional cada dia melhor. Também a Professora Doutora Sandra Zago Falone, por toda amizade, carinho e principalmente por sempre acreditar em mim e me ajudar, mesmo quando eu era apenas um calouro no curso de Licenciatura em Química.

Aos alunos de iniciação científica que me auxiliaram nesta jornada, em especial ao José Wilson e a Hellen Ferreira, que estiveram comigo e acreditaram neste sonho, mesmo quando os experimentos deram errado. Vocês se tornaram amigos muito especiais, com vocês eu aprendi, ensinei e compartilhei grandes momentos.

Aos colegas do Laboratório de Química Tecnológica – QUITec.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, instituição da qual me orgulho muito, responsável por minha formação desde o curso técnico até a pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão de bolsa de estudo.

A todos vocês, o meu sincero obrigado!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Manoel Aguiar Neto Filho, filho de Manoel Aguiar Neto e Áurea Alves de Aguiar, natural de Rio Verde - Goiás. Iniciou sua formação profissional no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, no ano de 2009, com o curso Técnico em Contabilidade, concluindo-o em 2010. Em 2011 iniciou o curso de Licenciatura em Química na mesma Instituição e quatro anos depois (em 2015) concluiu seu curso com o título de Licenciado em Química. Em março de 2015 ingressou no mestrado em Agroquímica também pelo Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde. Atualmente é professor de Química do Ensino Médio no Colégio Objetivo e Colégio Ápice, ambos em Rio Verde, GO.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Cerrado brasileiro.....	2
1.2 A cultura da mandioca (<i>Manihot esculenta</i> CRANTZ).....	4
1.3 Amido	6
1.4 Fungos.....	8
1.5 Enzimas.....	9
1.6 Etanol amilolítico.....	11
1.7 Referências bibliográficas.....	12
2. OBJETIVOS.....	17
2.2 Objetivo Geral.....	17
2.3 Objetivos Específicos	17
3. CAPÍTULO I – Complexo multienzimático para hidrólise a frio de amido granular de mandioca.....	18
3.1 Introdução	21
3.2 Procedimento experimental	22
3.3 Resultados e discussões	23
3.4 Conclusão.....	28
3.5 Referências bibliográficas.....	28
4. CAPÍTULO II – Otimização das condições de hidrólise de enzimas produzidas por <i>A. brasiliensis</i> , <i>A. niger</i> e <i>A. tubingensis</i> para produção de etanol utilizando amido granular de mandioca.....	31

4.1	Introdução	33
4.2	Procedimento experimental	34
4.3	Resultados e discussões	36
4.4	Conclusão.....	44
4.5	Referências bibliográficas.....	44
5.	CONCLUSÕES FINAIS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<hr/>	
Revisão Bibliográfica	
Figura 1: Localização do bioma cerrado no Brasil.	4
Figura 2 Estrutura da amilose e amilopectina, constituintes do amido.	6
Figura 3 Conformação das ligações glicosídicas da celulose e da amilose.	7
Capítulo 1	
Figura 1 Atividade amilolítica ($U\ mL^{-1}$) para todos os isolados fúngicos aos sete, 14 e 21 dias de incubação.	25
Figura 2 Atividade da amilase, endoglucanase e celulase para <i>A. brasiliensis</i> . $UI\ mL^{-1}$ é a unidade para todas as atividades enzimáticas.	26
Figura 3 Atividade da amilase, endoglucanase e celulase para <i>A. niger</i> . $UI\ mL^{-1}$ é a unidade para todas as atividades enzimáticas.	27
Figura 4 Atividade da amilase, endoglucanase e celulase para <i>A. tubingensis</i> . $UI\ mL^{-1}$ é a unidade para todas as atividades enzimáticas.	27
Capítulo 2	
Figura 1 Otimização do pH e temperatura das enzimas produzidas por <i>A. brasiliensis</i> ; em a) gráfico de contorno e em b) gráfico tridimensional.	37
Figura 2 Otimização do pH e temperatura das enzimas produzidas por <i>A. niger</i> ; em a) gráfico de contorno e em b) gráfico tridimensional.	37
Figura 3 Otimização do pH e temperatura das enzimas produzidas por <i>A. tubingensis</i> ; em a) gráfico de contorno e em b) gráfico tridimensional.	38
Figura 4 Sacarificação seguida de fermentação e sacarificação simultânea.	42

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 Classificação internacional das enzimas.....	10
--	----

Capítulo 1

Tabela 1 Atividade amilolítica (UI mL ⁻¹) dos três fungos mais ativos de acordo com o período de incubação (dias).....	26
---	----

Capítulo 2

Tabela 1 Codificação do pH e da temperatura do experimento de otimização.	35
Tabela 2 Açúcares redutores totais liberados pelo extrato bruto de cada microrganismo em cada tratamento após 6 horas de incubação	39
Tabela 3 Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>A. brasiliensis</i> frente a variações de pH e temperatura.	39
Tabela 4 Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>A. niger</i> frente a variações de pH e temperatura.	40
Tabela 5 Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>A. tubingensis</i> frente a variações de pH e temperatura.	40
Tabela 6 ANOVA para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>A. brasiliensis</i>	40
Tabela 7 ANOVA para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>A. niger</i>	40
Tabela 8 ANOVA para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>A. tubingensis</i>	49
Tabela 9 Composição centesimal da fécula de mandioca.	43
Tabela 10 Concentração (g L ⁻¹) de etanol produzido após 96 horas de sacarificação/fermentação.	43
Tabela 11 Rendimento do etanol produzido em relação ao rendimento teórico.	44

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACIONES E UNIDADES

(C ₇ H ₄ N ₂ O ₇)	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
µL	Microlitro
%	Porcentagem
°C.....	Graus Celsius
β	Beta
Abs.....	Absorbância
ART	Açúcares redutores totais
BDA	Batata, dextrose, ágar
DNS	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
FPU	Filter Paper Unit
g	Gramas
GO	Goiás
ITS.....	Espaçador transcrito interno
kg.....	Quilogramas
mg.....	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol
NaOH.....	Hidróxido de sódio
nm.....	Nanômetros
Nº	Número
pH.....	Potencial hidrogeniônico
T	Temperatura
rpm.....	Rotações por minuto

RESUMO

AGUIAR NETO FILHO, MANOEL. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Rio Verde -GO, fevereiro de 2017. **Bioprospecção de fungos amilolíticos para produção de etanol.** Carlos Frederico de Souza Castro “Orientador”; Fábio Henrique Dyszy “Coorientador”.

O crescimento demográfico tem aumentado o consumo energético em todos os setores da sociedade, especialmente no setor de transportes. Isto tem ocasionado aumento na demanda energética mundial, especialmente no setor de combustíveis. Surge aí a necessidade de alternativas aos combustíveis fósseis, neste cenário, o etanol é o principal biocombustível utilizado. No Brasil, é obtido principalmente a partir da cana-de-açúcar, porém é necessário viabilizar a utilização de novas matérias-primas que descentralizem a produção de etanol. As matérias-primas amiláceas aparecem como grande opção para complementar a produção de etanol. O amido é um polímero de carboidratos e para produzir etanol a partir de produtos como a mandioca por exemplo é necessário antes a etapa de sacarificação da mesma, para converter os açúcares complexos em açúcares mais simples, que sejam capazes de ser fermentados pelas leveduras. Este trabalho avalia 20 isolados fúngicos para a produção de amilases e suas enzimas auxiliares, celulase e endoglucanase para a completa hidrólise do amido granular. Os isolados fúngicos foram avaliados quanto a atividade das enzimas amilolíticas e enzimas auxiliares e determinou-se o rendimento da hidrólise do amido granular. Os isolados do gênero *Aspergillus* apresentaram a maior atividade amilolítica, sendo o *Aspergillus niger* o de maior atividade ($1,09 \text{ U mL}^{-1}$). As atividades de celulase e endoglucanase também foram avaliadas para *A. niger* – $13,66 \text{ U mL}^{-1}$ e $15,52 \text{ U mL}^{-1}$ – e o complexo multienzimático alcançou 43% de conversão para a hidrólise do amido granular de mandioca. Além disso

buscou-se otimizar as condições de hidrólise enzimática no que se refere ao pH e temperatura de enzimas produzidas pelos microrganismos *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* e realizou-se a sacarificação/fermentação simultânea para determinar o rendimento do etanol obtido. As três espécies de isolados fúngicos, *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis*, apresentaram valores ótimos de pH próximos uns dos outros – 5,1 a 5,7 – e também de temperatura – 61,5 °C a 64,7 °C. A sacarificação/fermentação simultânea dos microrganismos mostrou que o isolado *A. niger* apresentou a melhor produção de etanol a partir da utilização de amido granular de mandioca, com rendimento de 55,2%.

Palavras-chave: etanol, renovável, combustível, polissacarídeo, fermentação.

ABSTRACT

AGUIAR NETO FILHO, MANOEL. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Rio Verde-GO, February 2017. **Bioprospection of amylolytic fungi for the production of ethanol.** Carlos Frederico de Souza Castro "Adviser"; Fábio Henrique Dyszy "Co-Adviser".

Population growth has increased energy consumption in all sectors of society, especially in the transport sector. There arises the need for alternatives to fossil fuels, in this scenario, the ethanol is the major biofuel used. In Brazil, is obtained mainly from sugar cane, but it is necessary to make possible the use of new raw materials that the decentralized ethanol production. The starchy feedstocks appear as a great option to complement the production of ethanol. Starch is a polymer of carbohydrates and to produce ethanol from products like cassava, for example, is required a stage of saccharification, to convert the complex sugars into simpler sugars, which are capable of being fermented by yeasts. This paper evaluates 20 fungal isolates for the production of amylases and their auxiliary enzymes, cellulase and endoglucanase for the complete hydrolysis of granular starch. The fungal isolates were evaluated as amylolytic enzymes activity and auxiliary enzymes and has determined the efficiency of granular starch hydrolysis. The genus *Aspergillus* isolates showed the highest amylolytic activity, being the activity of *Aspergillus niger* (1.09 U mL⁻¹) the highest. Cellulase activities and endoglucanase were also evaluated for *A. niger* – 13.66 U mL⁻¹ and 15.52 U mL⁻¹ – and the multienzymatic complex reached 43% conversion for the hydrolysis of granular starch from cassava. In addition, it was tried to optimizing the enzymatic hydrolysis conditions as regards the pH and temperature of enzymes produced by micro-organisms *A. brasiliensis*, *A. niger* and *A. tubingensis* and the simultaneous saccharification/

fermentation was done to determine the yield of ethanol obtained. The three species of fungal isolates, *A. brasiliensis*, *A. niger* and *A. tubingensis*, optimum pH values close to each other – 5.1 to 5.7 – and temperature also – 61.5 °C a 64.7 °C. The simultaneous fermentation /saccharification of microorganisms showed that isolated *A. niger* presented the best production of ethanol from granular starch utilization of cassava, with 55.2% yield.

Key words: ethanol, renewable, fuel, polysaccharides, fermentation

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável e a proteção do meio ambiente exigem energias renováveis em vez de energias fósseis. Os biocombustíveis são a principal solução para a indústria de energia, sendo o etanol o biocombustível mais antigo e, até agora, amplamente considerado como uma das formas de energia mais promissoras a partir da biomassa (GAO et al., 2015). De acordo com Fukuda et al. (2009) a estimativa é de que aproximadamente 73% da produção mundial de etanol seja utilizada pelo setor de transportes.

Impulsionado pelo excessivo crescimento demográfico, ocasionado por uma urbanização acelerada, o uso de energia no Brasil começou a apresentar incrementos elevados a partir do término da II Guerra Mundial, além disso, o processo de industrialização e a construção de uma infraestrutura de transporte rodoviário também contribuíram para o aumento da demanda energética (TOLMASQUIM; GUERREIRO; GORINI, 2007).

Por motivos ambientais e tecnológicos o Brasil é apontado como o líder no setor de bioenergia (MASIERO; LOPES, 2008). Há duas estratégias comuns de produção de biocombustíveis: uma são cultivos ricos em açúcar (cana de açúcar, beterraba e sorgo doce) e a outra é o amido (milho, mandioca, inhame), e, em seguida, fazer o uso de leveduras de fermentação para produzir etanol (ADELEKAN, 2013). A produção e o uso do etanol no Brasil são hoje o melhor exemplo mundial da introdução de energia renovável com grande escala de produção (MACEDO, 2007). A principal matéria-prima para produção de etanol em regiões tropicais, como o Brasil, é a cana-de-açúcar (BARTH et al., 2014). Uma alternativa à substituição da cana-de-açúcar é o uso de xaropes obtidos a partir da hidrólise do amido (CURVELO-SANTANA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2010; FARIAS et al., 2009).

A mandioca é um importante produto agrícola e por apresentar elevado teor de amido, pode ser utilizada para a produção de etanol, além disso analisando a contabilidade energética das operações de cultivo, do processo industrial e das repercussões no agroecossistema, a mandioca pode revelar vantagens em relação ao milho e a cana-de-açúcar (SALLA et al., 2010). O emprego do amido para a produção de álcool levará ao desenvolvimento agroindustrial regiões como o Norte e o Nordeste, que são as maiores produtoras de mandioca do Brasil (CURVELO-SANTANA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2010; FARIAS et al., 2009).

Ao se utilizar matérias-primas mais complexas, ricas em amido, para produzir etanol, é necessária a realização de uma etapa de sacarificação antes da fermentação, estes polissacarídeos não são diretamente fermentescíveis. A maioria dos microrganismos não produz enzimas capazes de decompor açúcares mais complexos, desta forma, a etapa de sacarificação pode ser realizada por via química, utilizando ácido diluído (clorídrico ou sulfúrico, por exemplo), ou por adição direta de enzimas. A primeira apresenta algumas desvantagens, tais como: elevado consumo de energia, baixo rendimento e seletividade e pouca flexibilidade operacional. Em função disso, os processos enzimáticos assumiram maior importância, pois conseguiram eliminar quase totalmente essas desvantagens (FARIAS et al., 2009).

Para garantir a viabilidade econômica do processo de produção do etanol é fundamental reduzir o custo das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise do amido. Para isso, deve-se dispor da peça chave desse processo, que é o microrganismo produtor das enzimas. O Brasil se destaca em biodiversidade, possuindo vasto campo a ser explorado na busca de microrganismos que apresentem as características desejadas para tal aplicação (PIROTA et al., 2015). Enzimas, como amilases, podem ser produzidas por fungos e bactérias. A maior vantagem de se utilizar fungos para produzir amilases é a sua facilidade de manuseio e a economia do processo. As enzimas que degradam o amido têm recebido grande atenção, e estão sendo muito utilizadas para produzir glicose e posteriormente etanol. O potencial da utilização de fungos como fontes biotecnológicas de enzimas foi responsável por incentivar a renovação do interesse na exploração da atividade enzimática extracelular em vários microrganismos (BRIZZIO et al., 2007; GOMES et al., 2011; SALEEM; EBRAHIM, 2014).

1.1 O Cerrado brasileiro

O Cerrado (ilustrado na Figura 1) é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 23,92 % da área total do território nacional. Entende-se bioma como um conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelos agrupamentos de tipo de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, que apresentem condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças, resultando em uma diversidade biológica própria (IBGE, 2004).

O Cerrado é a mais diversificada savana tropical do mundo. Possuindo grande diversidade de habitats e alternância de espécies. O clima dessa região é estacional, onde há período chuvoso, que dura de outubro a março, e período seco, de abril a setembro (KLINK; MACHADO, 2005).

Segundo Machado et al. (2008) este bioma possui pelo menos três importantes características: alta riqueza, grande endemismo e grande heterogeneidade espacial. A distribuição das espécies não é homogênea ao longo do espaço e considerando o número de pesquisas existentes no Cerrado, o conhecimento científico é bastante precário, pois novas espécies estão sendo descobertas em cada levantamento faunístico e florístico realizado.



Figura 1 Localização do bioma cerrado no Brasil.

Fonte: (SANO et al., 2007).

1.2 A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ)

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ), é uma planta da família *Euphorbiaceae* (MAZOYER; ROUDART, 2010), é originária da América do Sul, na região sul da Amazônia (LÉOTARD et al., 2009). Está dentre as principais culturas do Brasil, sendo cultivada o ano todo, ocupando em 2014 uma área de 2,3 milhões de hectares, apresentando a produção média de 23 milhões de toneladas. A maior parte da produção nacional está concentrada nas regiões Norte e Nordeste, responsáveis por 34,60 % e 24,44 % da produção nacional, respectivamente. A região Centro-Oeste é responsável por 6,08 % da produção nacional e o estado de Goiás por 0,76 % (IBGE, 2015).

A planta de mandioca apresenta tolerância às condições adversas de clima e solo, estando presente em diversas regiões do mundo (TALMA et al., 2013), adapta-se

particularmente em ambientes de baixa disponibilidade de água e nutrientes (FIORDA et al., 2013). A tolerância a seca ocorre por causa do controle estomático altamente eficiente que a planta possui, de modo que em situação de déficit hídrico a planta fecha os estômatos diminuindo a condutância estomática e a transpiração, mantendo o potencial hídrico da folha por mais tempo (EL-SHARKAWY, 2006). Isso faz com que essa cultura apresente grande importância social e econômica, pela sua exploração em regiões de estações secas, em que ocorrem baixos níveis de índice de desenvolvimento humano (IDH) do Brasil e do mundo (CAVALCANTI, 2002).

A mandioca pode ser processada em variedade de produtos, incluindo chips, flocos, amido, farinha, etc. O uso desta cultura na composição de rações de gado também ganhou ampla aceitação na América Latina e na Ásia, além disso, ela também é utilizada como matéria-prima na produção industrial de produtos de padaria, dextrina, dextrose, glucose, lactose e sacarose. A indústria de alimentos e bebidas utiliza derivados de mandioca na produção de geleia de caramelo e goma de mascar. Indústrias farmacêuticas e químicas utilizam o álcool de mandioca (etanol) na produção de cosméticos e medicamentos. Sendo assim, existe grande procura por produtos derivados da mandioca tanto em mercados locais, como em mercados de exportação (ANYANWU et al., 2015).

O processamento dessa cultura resulta em variedade de resíduos sólidos, como: as cascas, o bagaço e resíduos líquidos (água de lavagem da raiz). Os principais produtos finais do processo industrial são a fécula e a farinha de mandioca, que apresentam grande relevância econômica; além disso, ela também é utilizada para consumo *in natura* (CASTIGLIONI et al., 2013).

Ceni et al. (2009) realizou avaliação de diferentes culturas de mandioca e relatou que a planta possui alto teor de umidade (64-70%), baixo teor de lipídios (0,33-3,5%) e de proteínas (1,2-1,8%), elevado teor de amido (24-39%) e baixo teor de polissacarídeos não amiláceos (1,5-2,7%), concluindo assim que a composição química da mandioca não depende apenas do cultivar, mas principalmente de fatores genéticos associados.

As raízes de mandioca podem conter até 60% de amido extraível que pode ser utilizado na produção de bioetanol. As gorduras e proteínas estão presentes na mandioca em pequenas quantidades e assim, boa parte do amido pode ser extraído com facilidade, hidrolisado, fermentado e destilado para produzir etanol (ADELEKAN, 2013). Em termos de energia a mandioca apresenta a melhor colheita energética utilizada para produzir etanol, pois, a produção de etanol por unidade de área de terra é a maior entre todas as culturas energéticas conhecidas. Apesar de a cana-de-açúcar apresentar maior

produtividade em comparação à mandioca, a enorme quantidade de água exigida durante o seu período de crescimento é forte limitação quando comparada com a mandioca que cresce sob condições muito mais secas (ANYANWU et al., 2015).

1.3 Amido

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra. A cada ano, a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas métricas de CO_2 e H_2O em celulose e outros produtos vegetais. Alguns carboidratos (açúcar e amido) são os principais alimentos da dieta em muitas partes do mundo, e sua oxidação é a principal via de produção de energia na maioria das células não fotossintéticas. Eles são polioidroxialdeídos ou polioidroxicetonas, ou substâncias que geram esses compostos quando hidrolisadas (NELSON; COX, 2011).

O amido é um homopolímero de α -D-glucose e existe em duas diferentes formas: amilose e amilopectina. Na amilose, os monômeros estão unidos exclusivamente nas posições α -1,4 através de ligações glicosídicas, já na amilopectina, os monômeros também são unidos predominantemente através das ligações α -1,4; porém ocorrem ramificações como resultado da formação de ligações glicosídicas do tipo α -1,6 (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

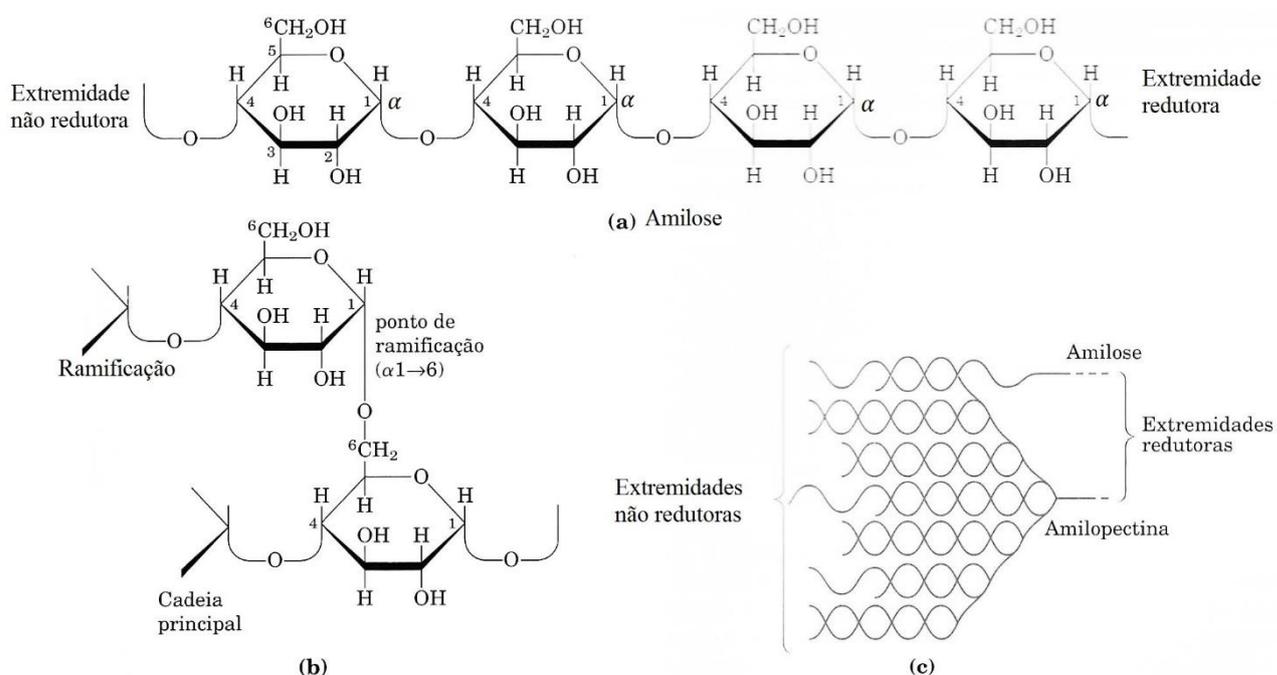


Figura 2 Estrutura da amilose e amilopectina, constituintes do amido.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2011).

Na figura 2, observa-se em (a) um segmento curto de amilose, um polímero linear de resíduos de d-glicose em ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$). Uma única cadeia pode conter milhares de resíduos de glicose. A amilopectina possui trechos de resíduos ligados de maneira similar, situados entre pontos de ramificação. Em (b) observa-se o ponto de ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$) na amilopectina. Em (c) existe um agrupamento de amilose e amilopectina como o que supostamente ocorre nos grânulos de amido. Fitas de amilopectina formam estruturas em hélice dupla umas com as outras ou com fitas de amilose. Os resíduos de glicose nas extremidades não redutoras das ramificações mais externas são removidos enzimaticamente durante a mobilização do amido para a produção de energia (NELSON; COX, 2011).

Sendo um material de reserva energética, a principal função do amido é ser metabolizado. Ele é mais passível de sofrer enzimólise que a celulose, que apresenta estrutura semelhante à sua. Os dois polímeros diferem-se apenas na estereo-química da ligação glicosídica, que apresenta conformação α no amido e β na celulose (HOWLING, 1989), como mostrado na Figura 3:

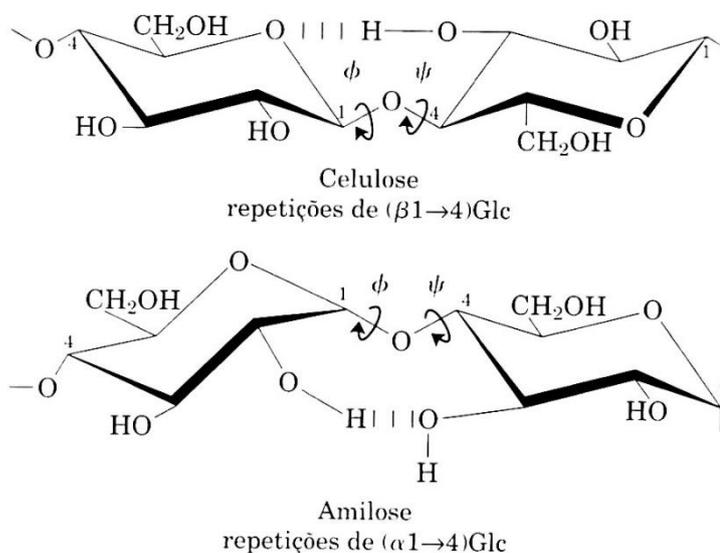


Figura 3 Conformação das ligações glicosídicas da celulose e da amilose.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2011).

As amilases são um grupo de hidrolases que podem clivar especificamente a ligação glicosídica do amido. Dois importantes grupos de amilases são glucoamilase e α – amilases. A glucoamilase hidrolisa as ligações $\alpha - 1,4$ a partir das extremidades não redutoras do amido, resultando na produção de glicose, em menor quantidade, também hidrolisa as ligações $\alpha - 1,6$ resultando também em glicose como produto final (PAVEZZI; GOMES; SILVA, 2008). As α – amilases são enzimas extracelulares que

clivam aleatoriamente as ligações α -1,4 glicosídica entre unidades de glicose em uma cadeia de amilose linear (ANTO; TRIVEDI; PATEL, 2006).

Os recentes avanços nas técnicas de catálise enzimática têm sido significativos em todas as frentes, tanto em perspectiva experimental quanto computacional. Em conjunto, estas técnicas tem se mostrado eficientes na superação de limites aparentes de um caminho evolutivo para a criação de catalisadores biológicos cada vez mais eficientes (DALBY, 2011).

1.4 Fungos

Fungos possuem um papel crucial no funcionamento do ecossistema. Eles facilitam a decomposição da matéria orgânica e a reciclagem de nutrientes em favor de seu próprio crescimento ou de outros organismos (A'BEAR et al., 2014; A'BEAR; JOHNSON; JONES, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A decomposição da matéria orgânica deve-se a capacidade que alguns fungos possuem de produzir enzimas que degradem diversas classes de materiais, por isso, esses microrganismos já são amplamente empregados em processos biotecnológicos (SCHUSTER et al., 2002).

Todos os fungos são quimio-heterotróficos, necessitando de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono. Sendo assim, eles são importantes na cadeia alimentar por decomporem a matéria vegetal morta, reciclando elementos vitais. Eles são utilizados pelo homem como alimento (cogumelos) e também para a produção de alimentos (pão e ácido cítrico) e drogas (penicilina). Das mais de 100 mil espécies conhecidas de fungos, apenas 200 são patogênicas aos humanos e aos animais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Enzimas, como amilases, produzidas por fungos e bactérias tem importante aplicação nas indústrias. A principal vantagem da utilização de fungos para a produção de amilases é a capacidade de produção em massa, o preço e a facilidade de manipulação. Enzimas que degradam o amido, como as amilases, têm recebido grande atenção pela sua importância tecnológica, e elas também são utilizadas para a produção comercial de glicose. Em sementes, por exemplo, o amido é hidrolisado e utilizado no crescimento das plântulas para satisfazer sua necessidade energética. O novo potencial de utilização dos microrganismos como fontes biotecnológicas de enzimas de importância industrial tem estimulado o interesse na exploração da atividade enzimática extracelular em vários

microrganismos (BRIZZIO et al., 2007; GOMES et al., 2011; SALEEM; EBRAHIM, 2014).

1.5 Enzimas

Conforme Nelson e Cox (2011, p. 183) “as enzimas estão no centro de cada um dos processos bioquímicos. Atuando em sequências organizadas, elas catalisam cada reação das centenas de etapas que degradam as moléculas e nutrientes, que conservam e transformam energia química”. Ainda segundo Nelson e Cox (2011) todas as enzimas são proteínas, exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas.

Como catalisadores, as enzimas aumentam de várias ordens de grandeza a velocidade das reações que catalisam por diminuir sua energia de ativação. Mesmo reações que tem água como reagente são catalisadas por enzimas. Por serem altamente específicas, “selecionam”, entre todas as reações potencialmente possíveis, aquelas que efetivamente irão ocorrer (MARZZOCO; TORRES, 2011).

Devido à alta especificidade das enzimas, ainda devemos observar que:

Embora o total da molécula enzimática seja necessário para o papel catalítico, a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima, chamada sítio ativo (ou centro ativo) da enzima. O sítio ativo constitui uma cavidade com forma definida, revestida por cadeias laterais de aminoácidos, algumas das quais ajudam a ligar o substrato e outras que participam diretamente da catálise. Esses aminoácidos são trazidos à proximidade uns dos outros pelos dobramentos da cadeia polipeptídica que definem a estrutura espacial da proteína. A forma do sítio ativo e os grupos R dos aminoácidos que dele fazem parte são responsáveis pela grande especificidade das enzimas, pois permitem à enzima “reconhecer” seu substrato. De fato, uma molécula, para ser aceita como substrato, deve ter uma forma espacial complementar à do sítio ativo e conter grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo (MARZZOCO; TORRES, 2011, p. 58).

Ao longo das últimas décadas os processos à base de enzimas têm continuamente substituído processos químicos tradicionais em muitas áreas, especialmente em indústrias químicas e farmacêuticas. O desenvolvimento de novas tecnologias, bem como a pressão econômica e a preocupação pública com a poluição ambiental faz com que este processo de substituição seja acelerado (CHOI; HAN; KIM, 2015).

As enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam, como mostra a Tabela 1. Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade (MARZZOCO; TORRES, 2011).

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas

Classe n°	Classe	Tipo de Reação
1	Óxidorredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C–C, C–S, C–O e C–N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: (NELSON; COX, 2011)

Segundo Marzzoco e Torres (2011), a atividade das enzimas depende das características do meio, especialmente de seu pH e temperatura. A maioria das enzimas possuem um valor de pH em que sua atividade é máxima e a velocidade da reação diminui de acordo com que este valor de pH se afasta do valor ótimo. Este valor é característico de cada enzima, mas com frequência está próximo do pH neutro. Já a respeito da temperatura, na maioria das reações químicas a velocidade é favorecida por sua elevação, que aumenta a energia cinética das moléculas, fazendo com que um número cada vez maior delas atinja o estado de transição. Porém, o gradativo aumento da velocidade só se verifica enquanto a enzima conservar sua estrutura nativa. Acima de 50-55 °C a maioria das proteínas – enzimas inclusive – são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações na conformação da molécula, acarretando na perda do poder de catálise.

1.6 Etanol amilolítico

Atualmente tem-se buscado desenvolver alternativas mais limpas em relação à queima de combustíveis à base de hidrocarbonetos, por questões ambientais e de oferta, principalmente para abastecer veículos automotivos. Em princípio, sua produção poderia ser sustentável indefinidamente no futuro, sem resultar na acumulação de dióxido de carbono adicional na atmosfera (BAIRD; CANN, 2011).

Segundo Baird & Cann (2011), o etanol tem sido usado como combustível de automóveis desde o final do século XIX. Uma característica deste combustível e que todos os combustíveis “oxigenados”, resultam em emissão mais baixa de muitos poluentes – especialmente monóxido de carbono, alquenos, aromáticos e particulados – quando comparados às emissões da combustão de gasolina pura ou diesel. Industrialmente, o etanol é produzido pela adição catalítica de água ao eteno, obtido do petróleo. Já o etanol combustível é produzido em escala massiva pela fermentação de carboidratos de plantas. Na América do Norte, a maioria dos carboidratos usados para a produção de etanol é derivada do amido presente em grãos de milho, ainda que trigo e outros grãos também sejam usados. No Brasil e alguns outros países tropicais, a sucrose da cana-de-açúcar é usada.

O emprego de amido como complemento e/ou alternativa à sacarose da cana-de-açúcar, poderia levar o desenvolvimento agroindustrial a várias regiões brasileiras que têm tradição no cultivo de amiláceos. No Brasil, existe a perspectiva de produção de álcool a partir de amiláceos, particularmente para produção de álcool para perfumes, para a indústria de bebidas alcoólicas e para a produção de xaropes com alta concentração de glicose, representando grande avanço tecnológico na industrialização do amido (FARIAS et al., 2009). Vários países em desenvolvimento, incluindo a Tailândia e a China, estão produzindo etanol a partir da mandioca (BAIRD; CANN, 2011).

Segundo Salla et al. (2010) a cadeia produtiva de mandioca é potencialmente sustentável e pode contribuir como alternativa energética para vários segmentos que demandam por combustíveis, sendo necessárias mais pesquisas fitotécnicas e industriais visando otimizar energeticamente as respectivas operações.

Destaca-se no processo industrial da mandioca o fato de que os amidos requerem altas quantidades de energia para os processos de hidrólise, porém, a cana de açúcar também demanda energia considerável no processo de extração, além de uma “reconstrução” do sistema de esmagamento, a cada período da safra de seis meses,

permanecendo ociosa durante os demais meses do ano; já as unidades processadas de amido operam os 12 meses do ano e podem diversificar suas produções intercalando outros materiais no mandiocal permitindo desta forma, a geração de diversos produtos, como farinhas, féculas, amidos modificados e etanol (SALLA et al., 2010).

1.7 Referências bibliográficas

A'BEAR, A. D. et al. Effects of isopod population density on woodland decomposer microbial community function. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 77, p. 112–120, out. 2014.

A'BEAR, A. D.; JOHNSON, S. N.; JONES, T. H. Putting the “upstairs–downstairs” into ecosystem service: What can aboveground–belowground ecology tell us? **Biological Control**, v. 75, p. 97–107, ago. 2014.

ADELEKAN, B. Investigation of ethanol productivity of cassava crop as a sustainable source of biofuel in tropical countries. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, 18 ago. 2013.

ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource technology**, v. 97, n. 10, p. 1161–6, jul. 2006.

ANYANWU, C. N. et al. Sustainability of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as industrial feedstock, energy and food crop in Nigeria. **Renewable Energy**, v. 81, p. 745–752, set. 2015.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

BARTH, D. et al. DesinFix™ 135 in fermentation process for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 323–325, 2014.

BRIZZIO, S. et al. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian journal of microbiology**, v. 53, n. 4, p. 519–25, 23 abr. 2007.

CASTIGLIONI, G. L. et al. Modelagem matemática do processo de secagem da massa fibrosa de mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 9, p. 987–994, set. 2013.

CAVALCANTI, J. **Perspectivas da mandioca na região semi-árida do Nordeste**. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/126521>>. Acesso em: 18 jul. 2015.

CENI, G. C. et al. Avaliação de componentes nutricionais de cultivares de mandioca (*Manihot Esculenta Crantz*). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 107–111, 2009.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, 5 mar. 2015.

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da produção de álcool de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 613–617, set. 2010.

DALBY, P. A. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 4, p. 473–80, ago. 2011.

EL-SHARKAWY, M. A. International research on cassava photosynthesis, productivity, eco-physiology, and responses to environmental stresses in the tropics. **Photosynthetica**, v. 44, n. 4, p. 481–512, dez. 2006.

FARIAS, D. et al. Potencial amilolítico do grão de milho maltado no processo de sacarificação do mesmo cereal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 855–862, jun. 2009.

FIORDA, F. A. et al. Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 408–416, dez. 2013.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**,

v. 44, n. 1, p. 2–12, abr. 2009.

GAO, J. et al. Efficient ethanol production from inulin by two-stage aerate strategy. **Biomass and Bioenergy**, v. 80, p. 10–16, set. 2015.

GOMES, J. et al. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 281–287, out. 2011.

HOWLING, D. Mechanisms of starch enzymolysis. **International Biodeterioration**, v. 25, n. 1–3, p. 15–19, jan. 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. **Mapa de Biomass e de Vegetação**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 19 jul. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201505.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2015.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707–713, jun. 2005.

LÉOTARD, G. et al. Phylogeography and the origin of cassava: new insights from the northern rim of the Amazonian basin. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 53, n. 1, p. 329–34, out. 2009.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 157–165, abr. 2007.

MACHADO, R. B. et al. Caracterização da fauna e flora do cerrado. In: OLIVEIRA, J.

F. DE; ALENCAR, L. S. G. (Eds.). . **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. 1ª ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 284–300.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 51, n. 2, p. 60–79, dez. 2008.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História da agricultura no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. 1ª ed. São Paulo: UNESP, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; SILVA, R. DA. Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 108–114, mar. 2008.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1606–1612, set. 2015.

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, n. 2, p. 90–97, abr. 2014.

SALLA, D. A. et al. Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 4, p. 444–448, abr. 2010.

SANO, E. E. et al. **Mapeamento de cobertura vegetal do bioma cerrado: estratégias e resultados**. 1ª ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger*--a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4–5, p. 426–35, ago. 2002.

TALMA, S. V. et al. Tempo de cozimento e textura de raízes de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 133–138, jun. 2013.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, mar. 2004.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. Matriz energética brasileira: uma prospectiva. **Novos Estudos - CEBRAP**, n. 79, p. 47–69, nov. 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial amilolítico de fungos isolados do bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol de mandioca.

2.3 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial amilolítico dos microrganismos isolados e selecionar três microrganismos com a melhor atividade amilolítica.
- Determinar a eficiência da hidrólise enzimática para os microrganismos selecionados.
- Otimizar as condições de pH e temperatura para a hidrólise enzimática dos microrganismos selecionados.
- Obter o rendimento do etanol produzido a partir das condições ótimas determinadas para os microrganismos selecionados.

3. CAPÍTULO I – Complexo multienzimático para hidrólise a frio de amido granular de mandioca

(Normas de acordo com o formato da Revista Ciência Rural)

RESUMO

A produção de etanol tem aumentado nos últimos anos, principalmente pela a sua utilização como combustível e ao grande número de matérias-primas disponíveis. Porém, novos processos com maior eficiência energética são necessários para reduzir os custos e o preço para o consumidor final. A hidrólise do amido granular conduzida abaixo da temperatura de gelatinização do amido pode reduzir a demanda energética e consequentemente os custos do processo. A amilase é a principal enzima necessária para a hidrólise do amido, porém, são necessárias várias enzimas auxiliares, tais como celulosas e endoglucanases, para aumentar o rendimento total. Este trabalho avalia diversos isolados fúngicos para a produção de amilases e suas enzimas auxiliares, celulase e endoglucanase para a hidrólise do amido granular. Os isolados fúngicos foram obtidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar processado na indústria e 20 espécies únicas foram identificadas por sequenciamento de DNA, sendo o gênero *Aspergillus* o mais comum (seis espécies). Os isolados fúngicos foram avaliados quanto a atividade das enzimas amilolíticas e enzimas auxiliares (celulase e endoglucanase) e determinou-se o rendimento da hidrólise do amido granular. Os isolados do gênero *Aspergillus* apresentaram a maior atividade amilolítica, sendo o *Aspergillus niger* o de maior atividade (1,09 U mL⁻¹). As atividades de celulase e endoglucanase também foram avaliadas para *A. niger* – 13,66 U mL⁻¹ e 15,52 U mL⁻¹ – e o complexo multienzimático alcançou 43% de conversão para a hidrólise do amido granular de mandioca.

Palavras-chave: etanol, renovável, combustível, polissacarídeo

CHAPTER I – A multienzyme complex for granular cold hydrolysis of cassava starch

(Standards in accordance with the *Ciência Rural* journal)

ABSTRACT

Ethanol production has increased over the past years, mostly due to its use as liquid fuel and the large number of available raw materials. But new low-energy processes are required in order to lower costs and prices to final consumer. Granular starch hydrolysis is conducted under starch gelatinization temperature and can lower energy demands and costs. Amylase is the main enzyme needed for starch hydrolysis, but it also needs several auxiliary enzymes, such as cellulases and endoglucanases, in order to increase total yield. This work assesses several fungal isolates for amylase production and its auxiliary enzymes, cellulase and endoglucase for overall granular starch hydrolysis yield. Fungal isolates were obtained from industry-processed sugarcane bagasse byproduct and 20 unique species were identified by DNA sequencing, *Aspergillus* genus was found to be the most common (six species). Fungal isolates were assessed for amyolytic and auxiliary enzymes activity and granular starch hydrolysis yield determined. *Aspergillus* isolates presented highest amylase activity, with *Aspergillus niger* been the highest among all (1.09 U mL⁻¹). Cellulase and endoglucanase activities were also assessed for *A. niger* - 13.66 U mL⁻¹ and 15.52 U mL⁻¹ - and its multienzyme mixture achieved 43 % conversation yield for cassava granular starch hydrolysis.

Key words: ethanol, renewable, fuel, polysacchar

3.1 Introdução

A maior aplicação do etanol é, atualmente, como combustível para motores. No Brasil, é vendido hidratado ou misturado à gasolina. Também apresenta grandes vantagens ambientais em relação aos combustíveis fósseis, por isso é utilizado em larga escala (BAEYENS et al., 2015).

A produção em grande escala do etanol é baseada na fermentação de carboidratos e muitas matérias-primas podem ser utilizadas, como, cana-de-açúcar, milho, trigo, beterraba ou fontes não alimentares (BAEYENS et al., 2015; CINELLI et al., 2015; GUO; SONG; BUHAIN, 2015).

A produção de etanol a partir de culturas amiláceas requer etapas de hidrólise enzimática para quebrar o amido. É um processo de alta demanda energética que envolve uma série de etapas. O amido é cozido a cerca de 110 °C e depois são introduzidas amilases para liquefação e sacarificação. O hidrolisado obtido é, então, fermentado e destilado com rendimento global de 43 % (m/v) (CINELLI et al., 2015; GUO; SONG; BUHAIN, 2015).

Esforços em pesquisa têm sido realizados no desenvolvimento de processos com custo energético reduzido e no screening de novos complexos multienzimáticos para aumentar o rendimento global e a eficiência do processo, a fim de reduzir o preço final do etanol produzido. Os custos da produção podem ser reduzidos se os passos de liquefação e sacarificação forem conduzidos em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização do amido, num processo denominado hidrólise do amido granular (CINELLI et al., 2015; DE SOUZA TEODORO; MARTINS, 2000).

Tem sido demonstrado que a hidrólise do amido granular necessita de enzimas auxiliares (celulases, xilanases e proteases). Um complexo multienzimático melhoraria a conversão do amido em glicose, e pode ser obtido utilizando fungos filamentosos para

produzir enzimas extracelulares brutas (ANDERSEN; POULSEN; HANSEN, 2016; CINELLI et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2007; MICHEL JR. et al., 2016).

Ainda assim, as amilases comercialmente disponíveis possuem algumas limitações, como baixa termoestabilidade, faixa estreita de pH, atividade catalítica lenta, custos de importação, direitos de patente e tempo de prateleira baixo. Tudo isso contribui para aumentar o preço da produção industrial e restringir as potenciais aplicações. A fim de reduzir os custos, os microrganismos cultivados no próprio local e o uso de resíduos agroindustriais locais como fonte de carbono, devem ser considerados como estratégias comerciais de baixo custo (ABD-ELHALEM et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2007; LAWAL et al., 2014; MIHAJLOVSKI et al., 2016).

O presente trabalho compara a atividade amilolítica de enzimas produzidas por 20 fungos isolados do bagaço de cana de açúcar e avalia o rendimento da conversão de amido para o microrganismo com a melhor atividade amilolítica.

3.2 Procedimento experimental

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram coletadas em duas indústrias localizadas no estado de Goiás, Brasil. As amostras foram coletadas em depósitos ao ar livre colocadas em sacos plásticos esterilizados, transportados para o laboratório e mantidos sobre refrigeração até o isolamento.

Cerca de 25 gramas de bagaço de cana de açúcar foram colocadas em 10 mL de água destilada, fechados e mantidos a 28 °C por 30 dias. 1 mL deste material foi diluído com 9 mL de água destilada e 100 uL foram transferidos para placas de petri contendo meio BDA e incubados a 28 °C por sete dias. As colônias isoladas dos fungos foram transferidas com uma haste para frascos contendo meio BDA e mantidos sobre refrigeração até sua utilização.

A identificação dos fungos foi conduzida através da extração de DNA do isolado fúngico, utilizando a região ITS entre os códigos de genes 18S e 28S. Iniciadores ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') foram utilizados para amplificar a região ITS. As sequências da β -tubulina e o fator de alongamento também foram utilizadas para identificar os isolados fúngicos, se necessário. As sequências obtidas foram comparadas com o GenBank utilizando o software Blastn (BORGES et al., 2009).

Os discos de micélio obtidos foram inoculados em placas de petri contendo meio BDA e incubadas por sete dias a 28 °C. Para a produção do extrato enzimático bruto, discos de micélio de 1 cm de diâmetro foram inoculados em Erlenmeyers esterilizados contendo meio basal Mandels & Weber (1969) com um grama de amido de mandioca, pH 4,5 e 28 °C, sobre agitação de 150 rpm, incubados por sete, 14 e 21 dias para a produção do caldo enzimático bruto.

O ensaio para amilases foi realizado utilizando 1 mL do caldo enzimático bruto diluído em tampão de ácido cítrico-citrato (pH 4,5), com 50 mg de amido de mandioca (50 g L⁻¹) e incubado por 60 minutos a 50 °C. Após a incubação, adicionou-se 1,5 mL do reagente DNS, os tubos foram colocados em banho maria por 5 minutos para o ensaio colorimétrico de determinação dos açúcares redutores totais, as leituras foram realizadas a 540 nm com espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 750 UV/VIS/NIR; segundo método de Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mmol de açúcares redutores por hora sobre as condições padrões. A atividade enzimática foi avaliada aos 7, 14 e 21 dias de incubação. Os ensaios de celulase e endoglucanase foram conduzidos de maneira similar, utilizando 50 mg de papel de filtro Whatman n° 1 (celulase) ou caboximetil celulase (endoglucanase) como substrato. Os controles negativos foram realizados após cinco minutos de ebulição das amostras para interromper a hidrólise enzimática. Utilizou-se soluções de glicose de concentração conhecida como controle positivo (GHOSE, 1987).

O rendimento da hidrólise foi determinado em Erlenmeyers, contendo 1 g de amido de mandioca (10 g L⁻¹) como substrato, 50 mL de solução tampão (pH 5,5), a 55 °C e 50 mL do extrato enzimático bruto. Incubou-se por 60 minutos e os açúcares redutores foram avaliados como descrito anteriormente. Foi utilizado como controle negativo a amostra com a enzima inativada.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e aplicou-se o teste Tukey para mensurar as diferenças significativas entre as espécies de fungos e o período de incubação (o nível de confiança adotado foi $p < 0,05$).

3.3 Resultados e discussões

Das amostras de bagaço de cana-de-açúcar coletadas foram isoladas 20 espécies fúngicas, nomeadamente: *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus*

fumigatus, *Aspergillus niger*, *Aspergillus novoparasiticus*, *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces formosus*, *Paecilomyces parvisporus*, *Paecilomyces saturatus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium sp.*, *Penicillium wotroi*, *Talaromyces stollii*, *Trichoderma asperelloides*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningiopsis*, composta por seis *Aspergillus*, três *Trichoderma*, três *Penicillium*, três *Fusarium*, três *Paecilomyces*, e um *Talaromyces*, todos pertencentes ao filo *Ascomycota*, e um *Mucor*, pertencente ao filo *Zycomycota*.

A ocorrência de grande número de espécies *Aspergillus* em amostras de bagaço de cana-de-açúcar indica que esta é uma matéria-prima promissora para desenvolver pesquisas com *Aspergillus*, que estão entre as espécies mais importantes utilizadas na produção de amilases industriais e se apresenta como a espécie encontrada em maior número (DE OLIVEIRA et al., 2007).

A atividade amilolítica para todas as 20 espécies isoladas é mostrada na Figura 1. A maioria dos isolados apresentou alguma atividade amilolítica, porém, os mais ativos pertencem ao gênero *Aspergillus*, nomeadamente: *A. brasiliensis* (GenBank KX880447), *A. niger* (GenBank KX880448), e *A. tubingensis* (GenBank KX880449).

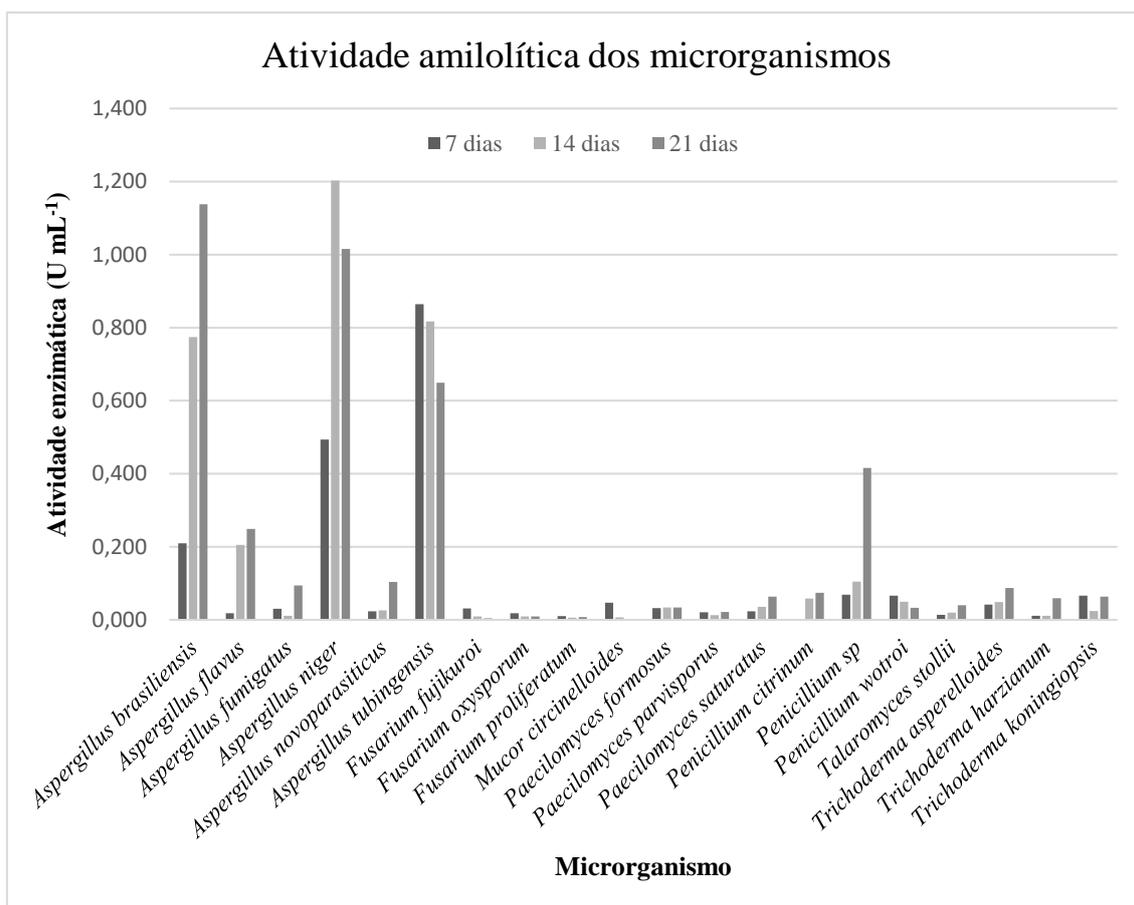


Figura 1 Atividade amilolítica (U mL⁻¹) para todos os isolados fúngicos aos sete, 14 e 21 dias de incubação.

A. niger apresentou a maior atividade amilolítica em 14 dias de incubação (1,09 U mL⁻¹) e isto foi equivalente à sua atividade aos 21 dias de incubação (0,96 U mL⁻¹) e ao *A. brasiliensis*, aos 21 dias de incubação (1,05 U mL⁻¹).

Há vários relatos sobre a alta produção de enzimas extracelulares por *Aspergillus*, sendo o *A. niger*, o mais citado. Os resultados para a atividade amilolítica para o *A. niger* e também para o *A. tubingensis* indicam aumento da atividade até o 14º dia de incubação, seguido pela diminuição, como mostrado na Tabela 1, isto pode ocorrer pelo aumento de substâncias tóxicas e a diminuição dos nutrientes do meio, ocasionando assim a redução da produção enzimática. Ao contrário, o *A. brasiliensis* apresenta sua atividade amilolítica máxima no 21º dia de incubação (OGBONNA et al., 2015).

Os valores numéricos da atividade amilolítica para *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* (Tabela 1) estão todos de acordo com os valores relatados na literatura. Ogbonna et al. (2015) obtiveram atividades enzimáticas máximas de 0,375 e 0,281 U mL⁻¹, para *A. niger* e *A. terreus*, respectivamente, ao 6º dia de incubação, utilizando amido solúvel como substrato. De Oliveira et al. (2007) usou enzimas brutas de espécies

Rhizopus e relataram atividade amilolítica máxima de 1,66 U mL⁻¹. Os valores para atividade de amilase bruta de *A. niger* variam de 11 a 13 U mL⁻¹ (LAWAL et al., 2014) e 0,18 a 6,8 U mL⁻¹ (ARZU, 2015). É relevante dizer que os resultados obtidos por Lawal et al. (2014) foram obtidos a mais alta produção de amilases para o isolado *A. niger*, já os estudos de Arzu et al. (2015) foram realizados em um meio de cultura otimizado, indicando assim influência da origem do isolado fúngico e do meio utilizado.

Tabela 1 Atividade amilolítica (UI mL⁻¹) dos três fungos mais ativos de acordo com o período de incubação (dias)

Fungos	Período de incubação (dias)		
	7	14	21
<i>A. brasiliensis</i>	0,23 ± 0,02F	0,75 ± 0,00CD	1,05 ± 0,05A
<i>A. niger</i>	0,50 ± 0,02E	1,09 ± 0,05A	0,96 ± 0,02AB
<i>A. tubiginensis</i>	0,84 ± 0,01BC	0,78 ± 0,06CD	0,65 ± 0,02D

Médias com letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05)

As atividades de celulase e endoglucanase foram avaliadas utilizando o extrato enzimático bruto para *A. brasiliensis*, *A. niger*, e *A. tubiginensis*, e avaliadas em uma base complementar para avaliação a ação sinérgica sobre a hidrólise do amido. A avaliação dos três isolados fúngicos analisados indica o *A. niger* como o mais ativo e balanceado, seguido pelo *A. tubiginensis* (Figuras 2, 3, 4).

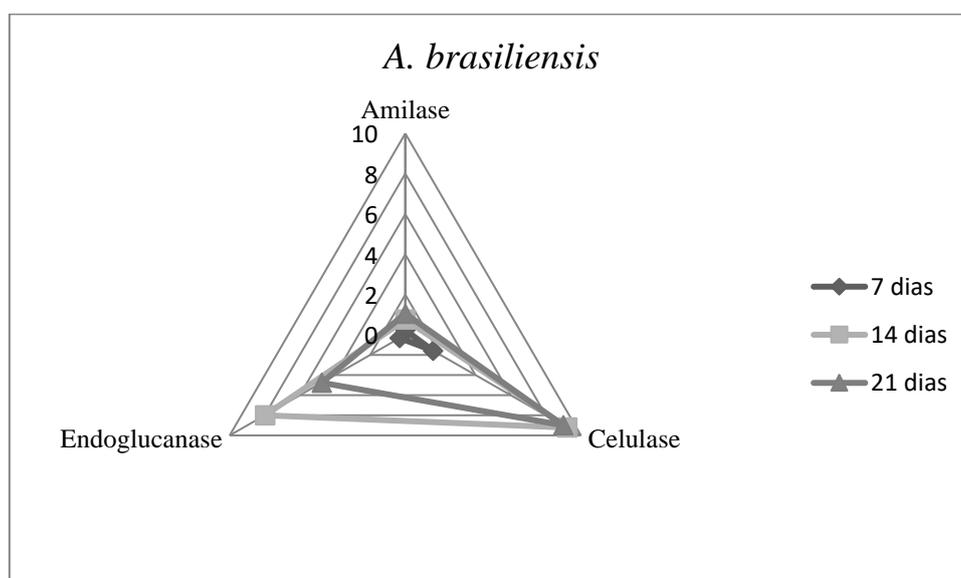


Figura 2 Atividade da amilase, endoglucanase e celulase para *A. brasiliensis*. UI mL⁻¹ é a unidade para todas as atividades enzimáticas.

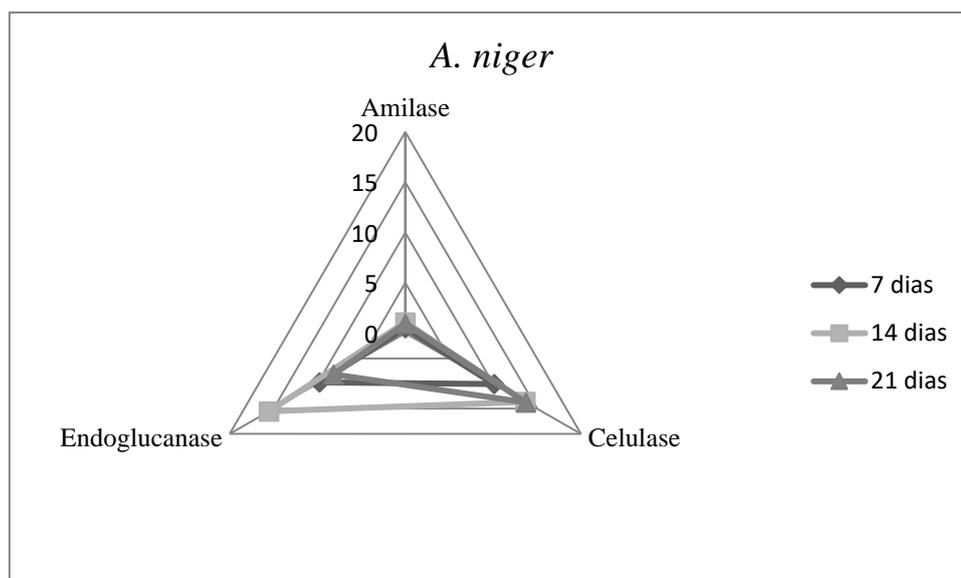


Figura 3 Atividade da amilase, endoglucanase e celulase para *A. niger*. $UI\ mL^{-1}$ é a unidade para todas as atividades enzimáticas.

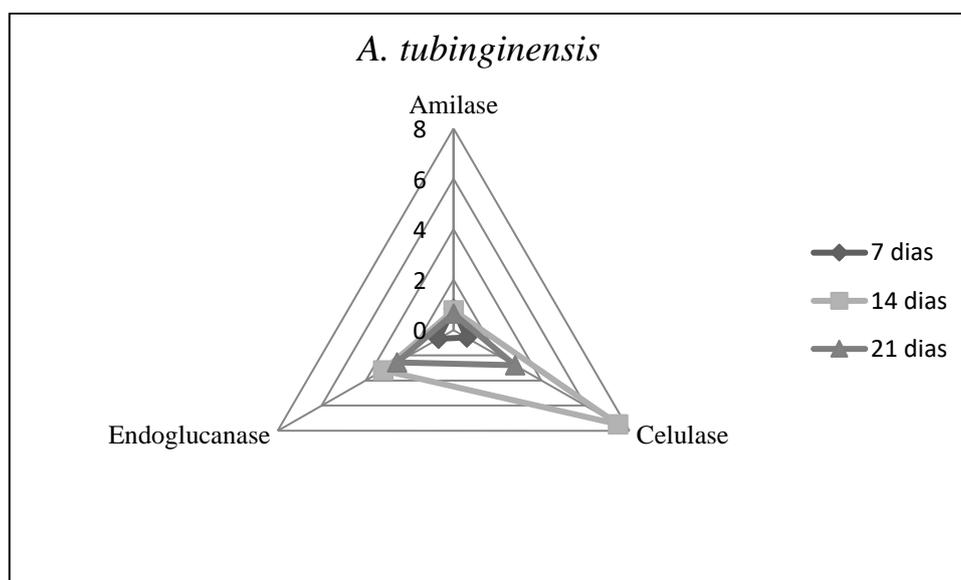


Figura 4 Atividade da amilase, endoglucanase e celulase para *A. tubingensis*. $UI\ mL^{-1}$ é a unidade para todas as atividades enzimáticas.

A. niger apresenta a mais alta atividade amilolítica ($1,09\ U\ mL^{-1}$ no 14º dia de incubação) e apresenta significativa atividade de celulase ($13,66\ U\ mL^{-1}$ no 14º dia de incubação) e atividade de endoglucanase ($15,52\ U\ mL^{-1}$ no 14º dia de incubação). Deste modo, foi conduzido um experimento com o caldo multienzimático bruto para avaliar a conversão do amido em açúcares redutores. O rendimento de conversão da hidrólise atingiu valor médio de $43 \pm 2\ %$, que está de acordo com os valores reportados anteriormente (CINELLI et al., 2015). Tais resultados confirmam a potencialidade de

extratos multienzimáticos brutos para a utilização na hidrólise industrial do amido granular a frio para produção de etanol.

Embora uma classe inteira de amilases trabalhe na hidrólise do amido, enzimas auxiliares, como proteases, celulasas, endoglucanases e peroxidases, auxiliam na hidrólise completa do amido. A necessidade de um complexo multienzimático pode ser justificada pelo fato de o amido não ser uma substância simples, mas uma matéria-prima com variedade de componentes, em vários graus, como: amido, celulose, lignina e proteína. A utilização de complexos multienzimáticos tem sido relatada em hidrólises com eficiência de 12% a 98% (CINELLI et al., 2015; MICHEL JR. et al., 2016).

3.4 Conclusão

Diversos fungos isolados do bagaço da cana-de-açúcar apresentam atividade amilolítica, e as espécies do gênero *Aspergillus*. - *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubiginensis* - apresentam as atividades amilolíticas mais altas encontradas. O isolado *A. Niger* apresentou a maior atividade amilolítica e foi o fungo que apresentou o melhor balanço de enzimas auxiliares (celulase e endoglucanase). A hidrólise do amido de mandioca utilizando o complexo multienzimático produzido a partir do *A. Niger* atingiu a conversão de 43% em açúcares redutores, indicando características promissoras para a utilização deste complexo multienzimático na hidrólise do amido granular a frio.

3.5 Referências bibliográficas

ABD-ELHALEM, B. T. et al. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 193–202, dez. 2015.

ANDERSEN, B.; POULSEN, R.; HANSEN, G. H. Cellulolytic and xylanolytic activities of common indoor fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 107, p. 111–116, 2016.

ARZU, U. Production of α -amylase from some thermophilic *Aspergillus* species and optimization of its culture medium and enzyme activity. **African Journal of**

Biotechnology, v. 14, n. 47, p. 3179–3183, 2015.

BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60–88, 2015.

BORGES, A. et al. CTAB methods for dna extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 4, p. 529–534, 2009.

CINELLI, B. A. et al. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. **Fuel**, v. 150, p. 721–729, jun. 2015.

DE OLIVEIRA, A. N. et al. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 208–216, 2007.

DE SOUZA TEODORO, C. E.; MARTINS, M. L. L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 298–302, 2000.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1 jan. 1987.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, n. 2015, p. 712–725, 2015.

LAWAL, A. K. et al. Production and partial purification of glucoamylase from *Aspergillus niger* isolated from cassava peel soil in Nigeria. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 13, n. 21, p. 2154–2158, 2014.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. (Eds.). . **Cellulases and their applications**. Advances in Chemistry.

MICHEL JR., R. J. S. et al. Enzymatic saccharification and fermentation of rice

processing residue for ethanol production at constant temperature. **Biosystems Engineering**, v. 142, p. 110–116, 2016.

MIHAJLOVSKI, K. R. et al. Improved α -amylase production on molasses and sugar beet pulp by a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 115–122, 2016.

OGBONNA, A. I. et al. Growth assessment and amylase production by *Aspergillus niger* and *A. terreus* isolated from soils of *Artemisia annua* l . Plantation. v. 3, n. 1, p. 10–16, 2015.

4. CAPÍTULO II – Otimização das condições de hidrólise de enzimas produzidas por *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* para produção de etanol utilizando amido granular de mandioca

(Normas de acordo com a revista *Scientia Agricola*)

RESUMO

A principal matéria-prima utilizada na produção do etanol, biocombustível mais utilizado atualmente, é a cana-de-açúcar, porém novas matérias-primas estão sendo estudadas a fim de descentralizar a matriz energética. Fontes ricas em amido, como a mandioca, podem ser utilizadas para esta finalidade, porém, são necessários processos que reduzam os custos da hidrólise enzimática do amido para tornar viável a produção de etanol a partir desta matéria-prima. Este trabalho otimizou as condições de hidrólise enzimática no que se refere ao pH e temperatura de enzimas produzidas pelos microrganismos *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* e realizar a sacarificação/fermentação simultânea para determinar o rendimento do etanol obtido. As três espécies de isolados fúngicos, *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis*, apresentaram valores ótimos de pH próximos – 5,1 a 5,7 – e valores de temperatura também próximos – 61,5 °C a 64,7 °C. A sacarificação/fermentação simultânea dos microrganismos mostrou que o isolado *A. niger* apresentou a melhor produção de etanol a partir da utilização de amido granular de mandioca, com rendimento de 55,2%.

Palavras-chave: etanol, renovável, combustível, polissacarídeo, fermentação.

**CHAPTER II – Optimization of enzyme hydrolysis conditions
produced by *A. brasiliensis*, *A. niger* and *A. tubingensis* for thanol
production using granular starch of cassava**

(Standards in accordance with the *Scientia Agricola*)

ABSTRACT

Abstract: The main raw material for the production of ethanol, the most used biofuel, is a sugar cane, still new raw materials are under study and seeking to decentralize an energy matrix. Starch-rich sources such as cassava can be used for this purpose, however, there were necessary processes which reduce the costs of enzymatic hydrolysis of the starch to make viable a production of ethanol from raw material. This work looks for optimization as enzymatic hydrolysis conditions with respect to the pH and temperature of enzymes produced by *A. brasiliensis*, *A. niger* and *A. tubingensis* microorganisms and to carry out simultaneous saccharification / fermentation to determine the yield of the ethanol obtained. The three species of fungal isolates, *A. brasiliensis*, *A. niger* and *A. tubingensis*, presented pH values close to each other - 5.1 to 5.7 - and also near temperature values - 61.5 °C to 64.7 °C. The simultaneous saccharification / simultaneous fermentation of the microorganisms showed that the isolation. *A. niger* presents a better ethanol production from the use of granular cassava starch in 55.2% yield.

Key words: ethanol, renewable, fuel, polysaccharides, fermentation

4.1 Introdução

Nas últimas décadas o uso intensivo de energias não renováveis proporcionou conquistas imprescindíveis a humanidade, no entanto, existem problemas, que vem causando alterações climáticas de forma irreversível; sente-se assim a necessidade de utilizar fontes de energia renováveis e limpas (SALLA; CABELLO, 2010).

O Brasil é apontado como líder no setor de bioenergia tanto por motivos ambientais, como tecnológicos (MASIERO; LOPES, 2008). Para produção de etanol, existem dois processos comuns: um é a utilização de cultivos ricos em açúcar (cana de açúcar, beterraba) e a outra é o amido (milho, mandioca), e, em seguida, fazer o uso de leveduras de fermentação para produzir etanol (ADELEKAN, 2013). Em regiões tropicais, como o Brasil, a principal matéria-prima para a produção de etanol é a cana-de-açúcar (BARTH et al., 2014). Porém, é possível utilizar xaropes obtidos a partir da hidrólise do amido como alternativa à cana-de-açúcar (CURVELO-SANTANA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2010; FARIAS et al., 2009).

A produção de etanol a partir de carboidratos complexos, como o amido, apresenta alta demanda energética, em sua maior parte na hidrólise do amido. Pode-se melhorar os custos da produção de etanol a partir de materiais amiláceos, por exemplo, caso a etapa de hidrólise ocorra em temperaturas inferiores a temperatura de gelatinização do amido (CINELLI et al., 2015). A cadeia produtiva de mandioca é potencialmente sustentável e a eficiência energética observada na produção de etanol é positiva (SALLA et al., 2010).

Além disso, a produção de etanol a partir da mandioca pode ser incentivada em regiões em que os solos são impróprios para o cultivo da cana-de-açúcar, porém, apropriadas para o cultivo da mandioca, que é menos exigente em fertilidade (SALLA; CABELLO, 2010). A utilização de enzimas para realizar a hidrólise do amido apresenta especificidade muito maior que a catálise química (TORRES; LEONEL; MISCHAN, 2012).

O presente trabalho propôs-se a determinar a temperatura e o pH ótimos de atuação das enzimas amilolíticas produzidas pelos fungos *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus tubingensis*; além de determinar a quantidade de etanol amilolítico obtido utilizando as enzimas produzidas por estes microrganismos.

4.2 Procedimento experimental

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram coletadas em duas indústrias de etanol localizadas no Estado de Goiás, Brasil. As amostras foram coletadas em depósitos ao ar livre e armazenadas em sacos plásticos esterilizados, transportados para o laboratório e mantidas em refrigeração até o isolamento.

Em erlenmeyers esterilizados, 25 g de bagaço de cana-de-açúcar foram colocados com 10 mL de água destilada e lacrados por 30 dias a 28 °C. 1 mL deste material foi diluído com 9 mL de água destilada e 100 uL foram transferidos para placas de petri com meio BDA e incubados a 28 °C por sete dias. Colônias isoladas dos fungos foram transferidas com uma haste em frascos com meio BDA e mantidos sobre refrigeração até a utilização.

A identificação dos fungos foi conduzida através da extração de DNA de discos de micélio dos isolados fúngicos, utilizando a região ITS entre o código dos genes 18S e 28S. Iniciadores ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') foram utilizados para amplificar a região ITS. β -tubulina e sequência de enlongamento também foram utilizadas para identificar os fungos, se necessário. As sequências obtidas foram comparadas com o GenBank utilizando o software Blastn (BORGES et al., 2009).

Discos de micélio das espécies *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* foram obtidos através da inoculação em placas de petri contendo meio BDA e incubados por sete dias a 28 °C. Para a produção do caldo enzimático bruto, discos de micélio de 1 cm de diâmetro foram inoculados em Erlenmeyers esterilizados contendo meio basal Mandels & Weber (1969) com um grama de amido de mandioca e pH a 28 °C, e mantidos em agitação a 150 rpm, incubados por sete dias para a produção do caldo enzimático bruto.

As análises químico-bromatológicas da fécula de mandioca foram realizadas com determinação da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro

(FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE) e cinzas pelo método descrito por Silva e Queiroz (2002). O teor de umidade foi determinado colocando porções de fécula de mandioca em cadinhos e levando em estufa a 100 °C por 24 horas, o teor de umidade foi calculado através da equação 1:

$$TU = 100 - \left[\left(\frac{MASC - MCV}{MAUC - MCV} \right) * 100 \right] \quad (\text{Eq 1})$$

Em que:

TU: Teor de umidade

MASC: Massa da amostra seca com cadinho

MAUC: Massa da amostra úmida com cadinho

MCV: Massa do cadinho vazio

Na otimização da hidrólise enzimática foi realizado planejamento fatorial de segunda ordem com base em cinco níveis e duas variáveis para estudar a influência da combinação do pH e da temperatura na atividade amilótica do caldo enzimático bruto. O planejamento foi realizado em 2 blocos, contendo 9 combinações, e o ponto central em quintuplicata. A codificação dos valores de pH e temperatura foram realizados conforme a Tabela 1:

Tabela 1 Codificação do pH e da temperatura do experimento de otimização.

Codificação	pH	Temperatura (°C)
- 1,267	2,3	33
-1	3,0	40
0	5,5	65
+1	8,0	90
+ 1,267	8,7	96
Incremento	2,5	25

Em erlenmeyers esterilizados de 125 mL foi adicionado 1 g de fécula de mandioca, uma carga enzimática de 10 U g⁻¹ (atividade amilolítica) do sobrenadante do caldo enzimático e o volume completado para 50 mL utilizando o tampão citrato de sódio/ácido cítrico. As amostras foram incubadas durante 6 horas à temperatura e pH correspondente de cada tratamento. A eficiência enzimática foi determinada através dos

açúcares redutores totais liberados, utilizando um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 750 UV-VIS/NIR a 540 nm, através do método de Miller (1959). Os valores ótimos de pH e temperatura foram obtidos pela metodologia de superfície resposta.

A fermentação para produção de etanol foi realizada segundo Santos et al. (2010) em que porções de fécula de mandioca a 1 % m/v foram submetidas em triplicata à hidrólise enzimática nas condições ótimas determinadas anteriormente e uma carga enzimática amilolítica equivalente a 10 U g⁻¹ de fécula em erlenmeyers de 125 mL. As enzimas foram adicionadas ao início do experimento em uma etapa de pré-sacarificação para realizar a hidrólise do amido durante 24 horas. Após esse período foi adicionado levedura *Saccharomyces cerevisiae* YP04 (cedida pelo professor Ubirajara Coutinho Filho da Universidade Federal de Uberlândia) numa concentração de 10 g L⁻¹. Esta etapa foi realizada a 32 °C durante 72 h, completando 96 h, no total entre sacarificação e fermentação. Ao término, o material foi filtrado e centrifugado. A concentração do etanol produzido foi determinado através do método do dicromato ácido, segundo Pacheco (2010). Esse método se baseia na oxidação de uma mistura hidroalcoólica à ácido acético, pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra. As leituras foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 750 UV-VIS/NIR a 600 nm.

O rendimento de etanol foi calculado através da razão entre o rendimento obtido e o rendimento teórico, em gramas, multiplicado por 100.

4.3 Resultados e discussões

As concentrações de açúcares redutores (ART g L⁻¹) obtidas nos experimentos para otimização através do planejamento fatorial para os três microrganismos estão representados na Tabela 2:

Tabela 2 Açúcares redutores totais liberados pelo extrato bruto de cada microrganismo em cada tratamento após 6 horas de incubação

Temperatura (°C)	pH	ART (g L ⁻¹)		
		<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
33	5,5	4,83 ± 0,01	1,03 ± 0,03	2,78 ± 0,06
40	3,0	3,35 ± 0,18	1,46 ± 0,06	5,27 ± 0,04
40	8,0	7,84 ± 0,59	0,25 ± 0,03	1,97 ± 0,07

65	2,3	$3,08 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,04$	$2,52 \pm 0,36$
65	5,5	$12,31 \pm 0,88$	$5,48 \pm 0,41$	$8,54 \pm 0,34$
65	8,7	$2,43 \pm 0,10$	$0,36 \pm 0,02$	$1,71 \pm 0,12$
90	3,0	$1,50 \pm 0,23$	$0,91 \pm 0,02$	$3,21 \pm 0,17$
90	8,0	$2,53 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,00$	$1,30 \pm 0,05$
96	5,5	$3,93 \pm 0,30$	$0,62 \pm 0,03$	$1,64 \pm 0,02$

Nas figuras 1, 2 e 3 pode observar o resultado das otimizações para os microrganismos *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* respectivamente.

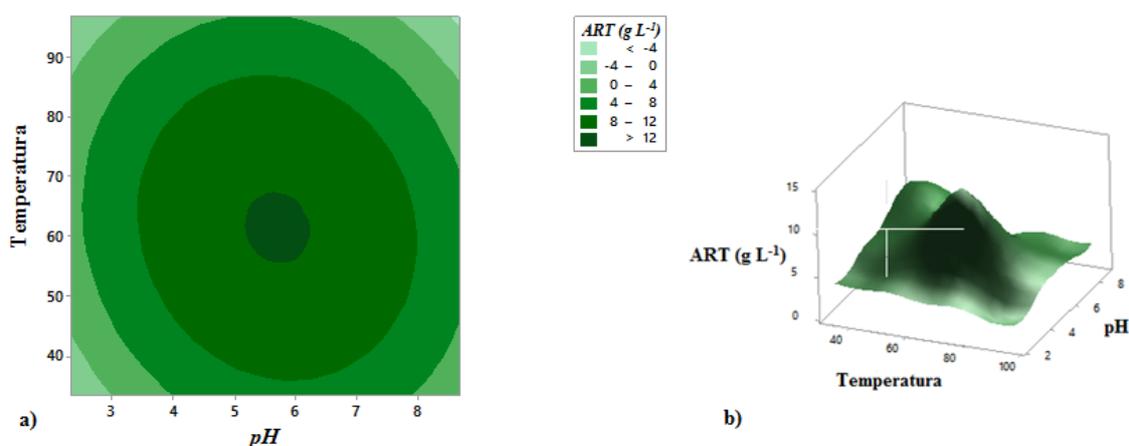


Figura 1 Otimização do pH e temperatura das enzimas produzidas por *A. brasiliensis*; em a) gráfico de contorno e em b) gráfico tridimensional.

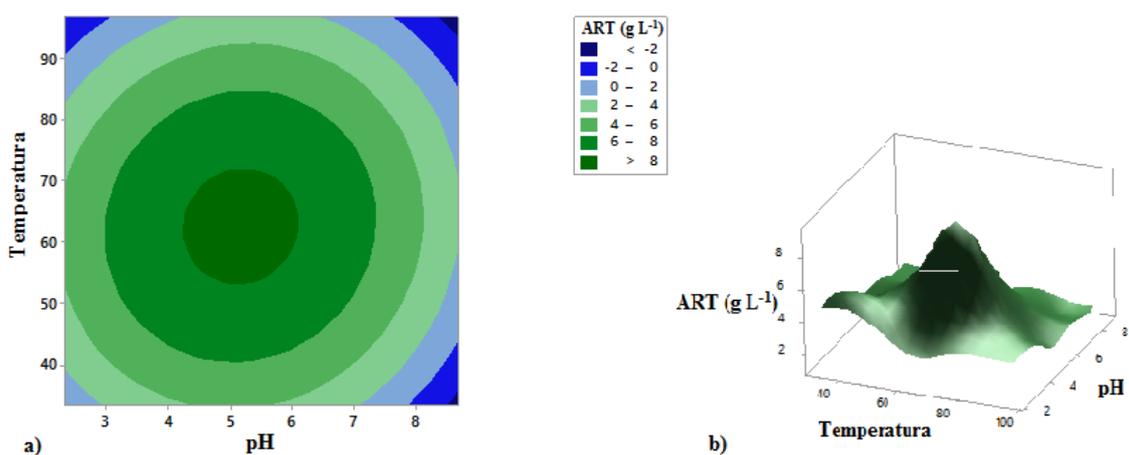


Figura 2 Otimização do pH e temperatura das enzimas produzidas por *A. niger*; em a) gráfico de contorno e em b) gráfico tridimensional.

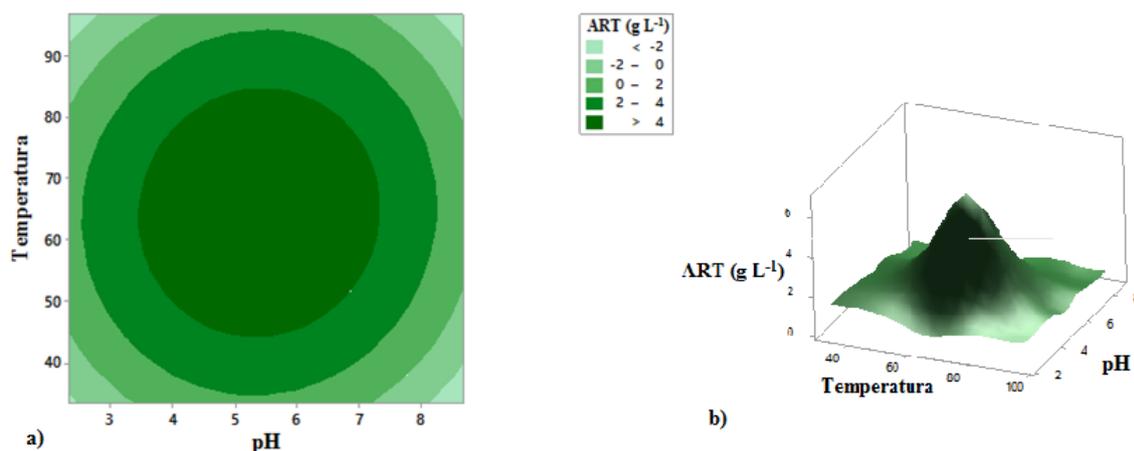


Figura 3 Otimização do pH e temperatura das enzimas produzidas por *A. tubingensis*; em a) gráfico de contorno e em b) gráfico tridimensional.

Observa-se na figura 1 a) e b) que a faixa de temperatura e pH ótimos é bem restrita e que distanciamentos deste ponto causam queda considerável na liberação de açúcares redutores. A temperatura e o pH que a enzima produzida por *A. brasiliensis* apresentou a melhor atividade foi de 61,5 °C e 5,7 respectivamente, o pico de atividade máximo é bem definido.

A partir dos resultados que geraram a Figura 2 a) e b) obteve-se temperatura ótima de 62,7 °C e um pH de 5,1.

Já na análise da Figura 3 a) e b) observa-se que a temperatura e o pH que a enzima produzida por *A. tubingensis* apresentou a melhor atividade foi de 64,7 °C e 5,4 respectivamente.

Os modelos matemáticos obtidos com o software Minitab17 que descrevem adequadamente a liberação de ART (g L^{-1}) em função da variação de pH e temperatura foram expressos pelas equações 2 (*A. brasiliensis*), 3 (*A. niger*) e 4 (*A. tubingensis*), mostradas abaixo:

$$[\text{ART (g L}^{-1}\text{)}] = -43,95 + 10,19 \text{ pH} + 0,887 \text{ Temp} - 0,8181 \text{ pH} * \text{ pH} - 0,006562 \text{ Temp} * \text{ Temp} - 0,01446 \text{ pH} * \text{ Temp} \quad (\text{Eq 2})$$

$$[\text{ART (g L}^{-1}\text{)}] = -22,84 + 4,907 \text{ pH} + 0,5973 \text{ Temp} - 0,5107 \text{ pH} * \text{ pH} - 0,005009 \text{ Temp} * \text{ Temp} + 0,00560 \text{ pH} * \text{ Temp} \quad (\text{Eq 3})$$

$$[\text{ART (g L}^{-1}\text{)}] = -24,07 + 4,748 \text{ pH} + 0,5296 \text{ Temp} - 0,4585 \text{ pH} * \text{ pH} - 0,004234 \text{ Temp} * \text{ Temp} + 0,00286 \text{ pH} * \text{ Temp} \quad (\text{Eq 4})$$

A significância dos termos do modelo de regressão quadrática foi estimada utilizando a análise de variância (ANOVA). Os modelos obtidos podem ser considerados de qualidade, visto que F_{calc} foi superior ao F_{tab} . Além disso um p -value menor do que 0,05 implica na significância estatística do modelo proposto para os experimentos. Assim pode-se observar através das tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 que a liberação de açúcares redutores pelo extrato bruto de *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* sofrem influência tanto do pH quando da temperatura; e implica dizer que estas variáveis são significantes para o modelo proposto. Além disso, pode-se observar que o coeficiente de correção (R^2) apontam que o modelo consegue descrever bem os dados obtidos experimentalmente, sendo que o modelo proposto para *A. brasiliensis* descreve 90,79% dos dados experimentais obtidos, já no caso dos extratos brutos de *A. niger* e *A. tubingensis*, o modelo consegue descrever 90,70% e 95,00% os dados experimentais, respectivamente. Os modelos propostos para explicar a liberação de açúcares redutores para os três microrganismos apresentaram $p < 0,05$ indicando significância do modelo proposto.

Tabela 3 Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de *A. brasiliensis* frente a variações de pH e temperatura.

Termo	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constante	12,126	0,498	24,34	0,000
pH	0,625	0,419	1,49	0,990
Temperatura	-1,131	0,419	-2,70	0,014
pH ²	-5,113	0,495	-10,33	0,000
Temperatura ²	-4,101	0,495	-8,28	0,000
pH x Temperatura	-0,904	0,562	-1,61	0,124
$R^2 = 90,79\%$, R^2 (pred) = 80,82%, R^2 (adj) 87,88%				

Tabela 4 Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de *A. niger* frente a variações de pH e temperatura.

Termo	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constante	8,359	0,344	24,33	0,739
pH	-0,864	0,289	-2,99	0,007
Temperatura	-0,579	0,289	-2,00	0,059
pH ²	-3,192	0,342	-9,34	0,000
Temperatura ²	-3,131	0,342	-9,17	0,000
pH x Temperatura	-0,350	0,388	0,90	0,378
$R^2 = 90,70\%$, R^2 (pred) = 78,89%, R^2 (adj) 87,76%				

Tabela 5 Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de *A. tubingensis* frente a variações de pH e temperatura.

Termo	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constante	5,736	0,208	27,60	0,000
pH	-0,273	0,175	-1,56	0,134
Temperatura	-0,253	0,175	-0,72	0,478
pH ²	-5,731	0,207	-13,87	0,000
Temperatura ²	-5,292	0,207	-12,81	0,000
pH x Temperatura	-0,357	0,235	0,76	0,455
R² = 95,00%, R² (pred) = 89,40%, R² (adj) 93,42%				

Tabela 6 ANOVA para liberação de ART pelo extrato bruto de *A. brasiliensis*.

Parâmetros	GL	SQ Adj.	QM Adj.	F calc	Valor-P
Modelo	6	473,616	78,936	31,22	0,000
Linear	2	24,098	12,049	4,77	0,021
Quadrado	2	442,983	221,491	87,60	0,000
Interação entre 2 fatores	1	6,534	6,534	2,58	0,124
Erro	19	48,040	2,528		
Falta de ajuste	11	35,611	3,237	2,08	0,153
Erro puro	8	12,428	1,554		
Total	25	521,655			

Tabela 7 ANOVA para liberação de ART pelo extrato bruto de *A. niger*.

Parâmetros	GL	SQ Adj.	QM Adj.	F calc	Valor-P
Modelo	6	222,809	37,135	30,88	0,000
Linear	2	15,608	7,804	6,49	0,007
Quadrado	2	206,084	103,042	85,69	0,000
Interação entre 2 fatores	1	0,980	0,980	0,81	0,378
Erro	19	22,848	1,203		
Falta de ajuste	11	21,305	1,937	10,05	0,002
Erro puro	8	1,542	0,193		
Total	25	521,655			

0

Tabela 8 ANOVA para liberação de ART pelo extrato bruto de *A. tubingensis*.

Parâmetros	GL	SQ Adj.	QM Adj.	F calc	Valor-P
Modelo	6	158,809	26,4682	60,16	0,000
Linear	2	1,308	0,6539	1,49	0,251
Quadrado	2	156,845	78,4223	178,24	0,000
Interação entre 2 fatores	1	0,256	0,2556	0,48	0,455
Erro	19	8,360	0,4400		
Falta de ajuste	11	6,784	0,6166	3,13	0,058
Erro puro	8	1,578	0,1972		
Total	25	167,169			

Segundo Gomes et al. (2007) a sacarificação do amido ocorre em pH 4,2 – 5,0 e temperaturas em torno de 55 – 60 °C; estes valores são próximos aos encontrados para a atividade máxima das enzimas produzidas pelos três microrganismos analisados. Ainda segundo estes autores, enzimas termoestáveis podem apresentar vantagens como por exemplo o menor controle da temperatura, já que para enzimas com baixa estabilidade a variação da temperatura pode resultar em rendimentos abaixo do esperado.

Observa-se que quando as temperaturas se distanciam do ponto ótimo nos três microrganismos analisados há perda de atividade catalítica, explicada pela desnaturação da enzima pelo efeito da temperatura. Biazus et al. (2006) relata que a temperatura de desnaturação das β -amilases e α -amilases situa-se em torno de 54 °C e 76 °C, respectivamente; e que as mesmas são desativadas em temperaturas maiores quando expostas a longo período de tempo (como qualquer outra enzima).

Reforçando os valores ótimos de pH encontrados, Pavezzi; Gomes & Silva (2008) relataram preservação de até 80% da atividade enzimática na faixa de pH entre 5,0 – 7,0 e afirmaram ainda que em pH alcalino a atividade enzimática é consideravelmente reduzida.

Após a determinação dos valores ótimos de pH e temperatura dos três microrganismos em estudo, foi realizada a sacarificação seguida de fermentação, dos mesmos, e a etapa de sacarificação durou 24 h seguida da adição de levedura para fermentação e sacarificação simultâneos. A figura 4 apresenta a variação quantitativa dos açúcares redutores ao longo do processo:

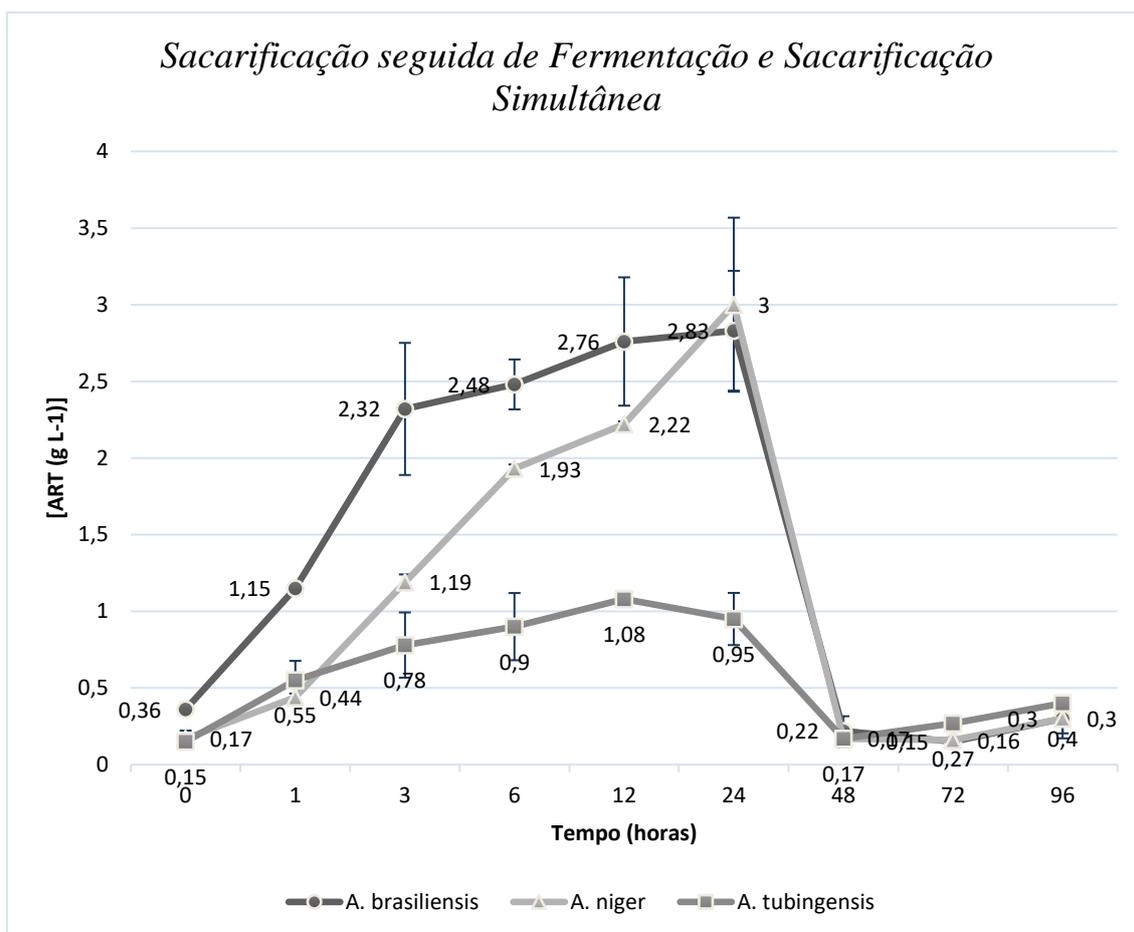


Figura 4 Açúcares redutores totais liberados durante a sacarificação seguida de fermentação e sacarificação simultânea para os três microrganismos.

Observa-se que a figura 4, mostra um perfil semelhante para os três microrganismos analisados, sendo que no início em que ocorreu a pré-sacarificação observa-se o aumento da quantidade de açúcares redutores e após a adição da levedura a diminuição progressiva destes açúcares. Para Santos et al. (2010) a realização da pré-sacarificação é vantajosa resultando em diminuição no tempo total do processo; e no experimento realizado, observa-se que a fermentação já havia sido concluída em 48 horas.

A análise químico-bromatológica de caracterização da fécula de mandioca utilizada está representada na tabela 9:

Tabela 9 Composição centesimal da fécula de mandioca.

Constituinte		Composição centesimal (%)
Amido		81,85
Umidade		12,32
Fibras	FDN	3,97
	FDA	0,38
Lípidios		0,87
Proteína		0,56
Cinzas		0,05

Ao final da sacarificação/fermentação, a concentração de etanol obtida foi representada na tabela 10:

Tabela 10 Concentração (g L⁻¹) de etanol produzido após 96 horas de sacarificação/fermentação.

Microrganismo	Etanol (g L ⁻¹)
<i>A. brasiliensis</i>	2,03 ± 0,08
<i>A. niger</i>	2,17 ± 0,07
<i>A. tubingensis</i>	1,51 ± 0,07

O rendimento de etanol foi calculado pela equação 5:

$$RE = \left(\frac{QEO}{QTE} \right) * 100 \quad (\text{Eq 5})$$

Em que;

QEO = Quantidade de etanol obtida

QTE = Quantidade teórica de etanol

$$QTE = 10 * 0,8185 * 0,48 = 3,93 \text{ g.L}^{-1} \text{ de etanol.}$$

Segundo as análises químico-bromatológicas realizadas, o teor de amido na fécula de mandioca utilizada é de 81,85%.

A conversão máxima de glicose em etanol é de 51 %; este é um dado básico na eficiência de conversão e é conhecido como coeficiente de Gay-Lussac (BRYAN, 1990). Porém, tal dado, considera a eficiência de 100% no processo e de acordo com Zanin et al. (2000) em fermentação contínua o processo apresenta máximo de 92% de conversão; sendo assim, pode-se corrigir o coeficiente de Gay-Lussac para 48%. Apresentando o mesmo raciocínio Aquarone; Lima & Borzani (1983) afirmam que o rendimento máximo

de etanol obtido em fermentações alcoólicas é de 48%, mesmo em condições ótimas de trabalho. Logo, o rendimento de etanol obtido está representado na tabela 11:

Tabela 11 Rendimento do etanol produzido em relação ao rendimento teórico.

Microrganismo	Rendimento de etanol (%)
<i>A. brasiliensis</i>	51,6
<i>A. niger</i>	55,2
<i>A. tubingensis</i>	38,4

A produção de etanol foi mais eficiente ao se utilizar o caldo enzimático bruto proveniente do microrganismo *A. niger*. Urbano; Suman & Leonel (2009) realizaram hidrólise e fermentação de manipueira (6,3 % de amido) e obtiveram rendimento de 38,4% na produção de etanol, sendo considerados os mesmos critérios de rendimento do presente trabalho e utilizando enzimas comerciais. Isto mostra que o rendimento obtido neste trabalho, utilizando enzimas de um caldo bruto, apresenta rendimento superior aos encontrados pelos autores acima citados.

4.4 Conclusão

Os microrganismos analisados *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* apresentaram valores de pH e temperaturas ótimos próximos entre si. O isolado *A. niger* apresentou a melhor taxa de conversão do amido em açúcares redutores e o seu fermentado apresentou a melhor taxa de rendimento, 55,2 %, mostrando assim como os outros dois microrganismos, promissores para a produção de etanol.

4.5 Referências bibliográficas

ADELEKAN, B. Investigation of ethanol productivity of cassava crop as a sustainable source of biofuel in tropical countries. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, 18 ago. 2013.

AQUARONE, E.; LIMA, U.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1983.

BARTH, D. et al. DesinFix TM 135 in fermentation process for bioethanol production.

Brazilian Journal of Microbiology, v. 45, n. 1, p. 323–325, 2014.

BIAZUS, J. P. M. et al. Otimização da secagem do malte de Zea mays. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 787–792, dez. 2006.

BORGES, A. et al. CTAB methods for dna extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 4, p. 529–534, 2009.

BRYAN, W. L. Solid-state fermentation of sugars in sweet sorghum. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 6, p. 437–442, jun. 1990.

CINELLI, B. A. et al. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. **Fuel**, v. 150, p. 721–729, jun. 2015.

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da produção de álcool de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 613–617, set. 2010.

FARIAS, D. et al. Potencial amilolítico do grão de milho maltado no processo de sacarificação do mesmo cereal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 855–862, jun. 2009.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, fev. 2007.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. (Eds.). . **Cellulases and their applications**. Advances in Chemistry. WASHINGTON, D. C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1969. v. 95p. 391–414.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 51, n. 2, p. 60–79, dez. 2008.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing

Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

PAVEZZI, F. C.; GOMES, E.; SILVA, R. DA. Production and characterization of glucoamylase from fungus *Aspergillus awamori* expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using different carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 108–114, mar. 2008.

SALLA, D. A.; CABELLO, C. ANÁLISE ENERGÉTICA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ETANOL DE MANDIOCA, CANA-DE-AÇÚCAR E MILHO. **ENERGIA NA AGRICULTURA**, v. 25, n. 2, p. 32, 10 jun. 2010.

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

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. 3ª Edição ed. Viçosa: Editora UFV, 2002.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1327–1332, jul. 2012.

URBANO, L. H.; SUMAN, P. A.; LEONEL, M. **Rendimento de processo de produção de etanol a partir de manipueira**. São Paulo: [s.n.].

ZANIN, G. M. et al. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1–9, p. 1147–1162, 2000.

5. CONCLUSÕES FINAIS

Diversos fungos isolados do bagaço da cana-de-açúcar apresentam atividade amilolítica.

A. brasiliensis, *A. niger*, e *A. tubiginensis* apresentam as atividades amilolíticas mais altas encontradas.

O isolado *A. niger* apresentou a mais alta atividade amilolítica e foi o fungo que apresentou o melhor balanço de enzimas auxiliares, celulase e endoglucanase.

A hidrólise do amido de mandioca utilizando o complexo multienzimático produzido a partir do *A. niger* atingiu a conversão de 43% em carboidratos redutores, o que indica características promissoras para a utilização deste complexo multienzimático para a hidrólise do amido granular a frio.

Os microrganismos analisados *A. brasiliensis*, *A. niger* e *A. tubiginensis* apresentaram valores de pH e temperaturas ótimos próximos entre si.

O isolado *A. niger* apresentou a melhor taxa de conversão do amido em açúcares redutores e o seu fermentado apresentou a melhor taxa de rendimento, 55,2 %, estando acima de valores relatados na literatura, mostrando-, assim como os outros dois microrganismos analisados, promissores para a produção de etanol.