

POTENCIAL AMILOLÍTICO DO GRÃO DE MILHO MALTADO NO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DO MESMO CEREAL

Amylolytic potential of maize malt in the process of saccharification of the same cereal

Daniele Farias¹, Ana Cláudia Margarites², Christian Oliveira Reinehr³,
Luciane Maria Colla⁴, Jorge Alberto Vieira Costa⁵, Telma Elita Bertolin⁶

RESUMO

Objetivou-se avaliar o potencial de sacarificação do malte de milho para produção de álcool deste cereal. Para tal, foi realizada germinação do grão de milho a 20 °C por 5 dias. O potencial amilolítico do malte de milho foi otimizado por meio de um Planejamento Fatorial Completo 2² com 3 pontos centrais, sendo as variáveis de estudo a temperatura de incubação e concentração de substrato [S]. A sacarificação foi realizada por meio de um Planejamento de Mistura com três pontos centrais, sendo as variáveis de estudo a concentração de malte e concentração de substrato, durante 6 horas. A fermentação foi conduzida com a melhor condição de sacarificação, em reator de 5 L e volume útil de 2 L. O pH foi fixado em 4,5-5. O Brix foi acertado para o valor de 14°. O mosto hidrolisado foi esterilizado e inoculado com 5,0 g.L⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de fermento comercial liofilizado. O sistema foi submetido a 2 horas de aeração inicial (170 L_{O₂}.h⁻¹) e mantido na temperatura de 30 °C. Durante o processo de fermentação, foram realizadas determinações da concentração de células (g.L⁻¹), açúcares redutores (mg.mL⁻¹) e álcool (g.L⁻¹). As variáveis temperatura de incubação e concentração de substrato foram significativas (p < 0,05) na condição de estudo de 20 % de substrato e incubação a 70 °C. Os experimentos centrais com 50 % de malte apresentaram os melhores parâmetros cinéticos com taxa volumétrica de formação de produto em etanol de 2,81 g_{etanol}.L⁻¹.h⁻¹ que corresponde a 8,0 °GL e conversão de substrato em células 0,127 g_{célula}.g_{glucose}⁻¹.

Termos de indexação: Amido, enzimas amilolíticas, fermentação alcoólica e sacarificação.

ABSTRACT

The aim of this research was the production of maize malt and the evaluation of its use for alcohol production. The maize grain was allowed to germinate at 20°C for five days. The amylolytic potential of malt was optimized through a Complete Factorial Planning 2² with three central points, where the study variables were the temperature of incubation and the substrate concentration [S]. The saccharification was performed through a Planning of Mixture with three central points, where the study variables were the malt concentration and [S] during six 6 hours. The fermentation was carried out using the best saccharification condition, in a five-liter reactor and a two-liter working volume. The pH was maintained at 4.5 – 5.0. The Brix was corrected to 14°. The sterile hydrolyzed product was inoculated with 5.0 g.L⁻¹ *Saccharomyces cerevisiae*. The system was submitted to two hours of initial aeration (170 L_{O₂}.h⁻¹) and kept at 30°C. During the fermentation process, analyses were made to determine the cell concentrations (g.L⁻¹), reducing sugars (mg.mL⁻¹), alcohol (g.L⁻¹) and °Brix. The temperature of incubation and substrate concentration were significant factors (p < 0.05) in the determination of the amylolytic potential under the conditions of study utilizing 20% of substrate and incubation at 70°C. The central experiments with 50% malt presented the best kinetic parameters with a volumetric rate of ethanol formation of 2.81 g_{ethanol}.L⁻¹.h⁻¹, which correspond to 8.0 °GL, and a substrate conversion in cells of 0.127g_{cells}.g_{glucose}⁻¹.

Index terms: Amylolytic enzymes, alcoholic fermentation, saccharification, and starch.

(Recebido em 12 de dezembro de 2006 e aprovado em 9 de julho de 2008)

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é um cereal amplamente cultivado no estado do Rio Grande do Sul com excedente que poderia ser aproveitado para a geração de produtos

como álcool e aguardente, visando a proporcionar uma possibilidade de renda alternativa para pequenos produtores rurais (Urigo & Eigel, 1999). Segundo a Embrapa Milho e Sorgo (MG), dados do CONAB de 2006, 90 % da produção de milho concentram-se na região Sul, sendo o

¹Engenheira de Alimentos – Faculdade de Engenharia e Arquitetura/FEAR – Universidade de Passo Fundo/UPF – BR 285 – São José – Cx. P. 611 – 99052-900 – Passo Fundo, RS – danielefarias_@hotmail.com

²Engenheira de Alimentos – Faculdade de Engenharia e Arquitetura/FEAR – Universidade de Passo Fundo/UPF – BR 285 – São José – Cx. P. 611 – 99052-900 – Passo Fundo, RS – anacmargarites@yahoo.com.br

³Engenheiro de Alimentos, Mestre em Ciência e Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia e Arquitetura/FEAR – Universidade de Passo Fundo/UPF – BR 285 – São José – Cx. P. 611 – 99052-900 – Passo Fundo, RS – reinehr@upf.br

⁴Engenheira de Alimentos, Doutora em Ciência e Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia e Arquitetura/FEAR – Universidade de Passo Fundo/UPF – BR 285 – São José – Cx. P. 611 – 99052-900 – Passo Fundo, RS – lmcolla@upf.br

⁵Engenheiro de Alimentos, Doutor em Engenharia de Alimentos – Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande/FURG – Rua Alfredo Huch, 475 – Cx. P. 474 – 96201-900 – Rio Grande, RS – jorgealbertovc@terra.com.br

⁶Doutora em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutico – Faculdade de Engenharia e Arquitetura/FEAR – Universidade de Passo Fundo/UPF – BR 285 – São José – Cx. P. 611 – 99052-900 – Passo Fundo, RS – telma@upf.br

estado do Rio Grande do Sul responsável por 14 % desta produção.

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. O milho, o arroz, o trigo e a própria cevada não maltada, além de féculas de batata ou de mandioca (polvilho doce) são os adjuntos ou complementos mais comuns utilizados no preparo da cerveja e bebidas alcoólicas de amiláceos (Venturini Filho & Cereda, 1998; Ambev, 2005).

Essas matérias-primas, contudo, não são diretamente fermentáveis, exigindo hidrólise prévia do amido. A sacarificação ou hidrólise do amido pode ser ácida ou enzimática. 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 que totalmente essas desvantagens (Evangelista et al., 2005).

A via da hidrólise enzimática inclui a utilização do malte. O processo de obtenção do malte ou malteação consiste nas etapas de maceração, germinação e secagem. O início da germinação estimula a produção de enzimas amilolíticas, α -amilases e β -amilases, que hidrolisam o amido (Reguly, 1996; Venturini Filho & Cereda, 1998). O produto obtido denomina-se malte e caracteriza-se por seu alto poder diastásico (capacidade para hidrolisar o amido) e pelo conteúdo de substâncias tais como: açúcares, aminoácidos e peptídeos (Georg-Kraemer et al., 2001) que posteriormente servirão de substrato para as leveduras no processo de fermentação.

De acordo com Venturini Filho & Cereda (1998), o poder amilolítico do malte determina a quantidade de adjunto a ser utilizado na formulação da cerveja. A produção de malte brasileiro é limitada em quantidade e qualidade, onde apenas a cevada é empregada nesse uso. A cevada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) é cultivada no Brasil para fins cervejeiros, desde a década de 1930. O Brasil destaca-se como o segundo maior produtor de cevada cervejeira da América Latina, seguido da Argentina, com uma produção anual de 275 mil toneladas (ano de 2001). O estado de Rio Grande do Sul é o maior produtor do país, com uma produção de 97 mil toneladas de produto (68,1 %), seguido pelo estado do Paraná (30,6 %), a região do Cerrado (Goiás e Minas Gerais) e Santa Catarina (Minella, 2002).

Apesar da potencialidade de auto-suficiência, a produção nos últimos anos vem atingindo em média apenas um terço da capacidade interna de malteação, estabilizada atualmente em aproximadamente 360.000 t/ano. O déficit

entre a oferta e a demanda está associado, principalmente, ao maior custo do produto interno relativo ao importado e à instabilidade da quantidade e qualidade da produção doméstica (Minella et al., 1999).

A maltagem do milho poderia ser uma alternativa para agregar valor a esse produto como também para a obtenção de diferentes enzimas hidrolíticas (Farias et al., 2007), as quais são requeridas em proporções importantes na produção de álcool de cereais para a indústria química, farmacêutica e de alimentos (Reguly, 1996).

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 um grande avanço tecnológico na industrialização do amido (Bertolin et al., 2003; Biazus et al., 2005).

A produção de etanol por via fermentativa é uma tecnologia muito desenvolvida no Brasil, cuja transferência renderia muitas divisas ao país e colocá-lo-ia em condições muito favoráveis no panorama energético (Zanin et al., 2000). Na atualidade, nosso país produz 16 bilhões de litros de álcool e novos investimentos são anunciados a cada dia e a expectativa é a de que a produção possa dobrar em um espaço de dez anos (Sauer et al., 2006). Nesse contexto, objetivou-se estudar o potencial amilolítico do grão de milho maltado no processo de sacarificação do amido de milho e no posterior rendimento em álcool.

MATERIALE MÉTODOS

Obtenção de malte

Os grãos de milho foram fornecidos pelo Centro de Pesquisas Agropecuárias (CEPAGRO) da Universidade de Passo Fundo (UPF), e submetidos a uma seleção manual, retirando-se grãos partidos, mofados e injuriados. O grão utilizado apresentou umidade de 13,10 %, proteína (8,70 %), cinzas (1,42 %), fibra detergente neutro (11,90 %), lipídios (4,55 %) e carboidratos (60,33 %). O poder germinativo foi de 95 %. As amostras foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 2,5 % a fim de evitar contaminação por microrganismos. O milho foi macerado durante dois dias, a 4 °C para elevar a umidade do grão na faixa de 40 a 45 %. Para tal, utilizou-se água destilada estéril na proporção de uma parte de grão para três de água. A água foi renovada a cada 12 horas, mantendo a temperatura constante a cada renovação de água (Reguly, 1996).

O grão macerado foi conduzido à germinação em estufa (De Leo 391) a 20 °C durante cinco dias. A germinação foi interrompida mediante secagem em estufa com

circulação de ar (Odontobrás E.L) a 50 °C até umidade final de aproximadamente 12 %. A umidade dos grãos de malte foi determinada a partir de 5 g de amostra seca em estufa (Biomatic) durante 24 horas a 105 °C, a qual apresentou umidade final de 8 %, proteína (10,44 %), lipídios (4,12 %), carboidratos (63,36 %), cinzas (1,38 %) e fibras (12,70 %). O malte seco foi submetido à moagem em blender (Corning), 60 mesh e embalado a vácuo em sacos de polietileno.

Avaliação do poder distásico do malte

A avaliação do poder distásico do malte foi estudada, baseando-se nas referências de temperaturas ótimas de atuação das amilases do malte de cevada de indústrias cervejeiras (Reguly, 1996). As condições reacionais para determinação do potencial amilolítico do malte foram realizadas por meio de um Planejamento Fatorial Completo 2² (PFC 2²) com 3 pontos centrais, sendo as variáveis de estudo temperatura de incubação (40 °C, 50 °C e 70 °C) e concentração de substrato (amido) (10 %, 15 % e 20 %). A matriz do PFC 2² com 3 pontos centrais está apresentada na Tabela 1.

A extração das enzimas amilolíticas foi realizada a partir de 1 g de malte, adicionando-se 15 mL de tampão TRIS – HCl 0,1 M a pH 5,0. Essa mistura foi triturada por 5 min com pistilo em gral de porcelana, conforme Aragão et al. (2002). A atividade das amilases totais (α -amilases e β -amilases) foi medida em um sistema de reação contendo amido solúvel (Merck), segundo o PFC 2² e 1 mL de solução de enzima extraída. O sistema de reação foi incubado nas diferentes temperaturas de estudo do PFC 2², durante 15 min. Para interromper a atividade, o sistema foi inativado com 1 mL de NaOH 1N. Para a determinação da atividade das α -amilases, procedeu-se da mesma forma, porém, antes da realização do ensaio as outras amilases foram inativadas a 70 °C por 15 min. Os açúcares redutores foram quantificados por meio do método de 3,5-DNS segundo Miller (1959).

O PFC² da Tabela 1 permitiu a escolha da condição ótima de temperatura de incubação e concentração de substrato para o processo de sacarificação. Os resultados da atividade enzimática foram avaliados por meio da análise de variância e Teste de Tuckey.

Sacarificação e Fermentação Alcoólica

A sacarificação e posterior fermentação foram realizadas por meio de um Planejamento de Mistura (PM) com três pontos centrais, onde as variáveis de estudo foram concentração de malte e a concentração de substrato (milho não maltado). A Tabela 3 apresenta a matriz do PM com as variáveis reais e codificadas.

Foram realizados processos de sacarificação do malte de milho com o objetivo de estudar o potencial hidrolítico das enzimas presentes no malte. Para isso, fez-se necessário quantificar a percentagem de amido presente nos grãos de milho e no malte submetidos à sacarificação. A determinação do amido dos grãos de milho e do malte foi realizada via hidrólise ácida. Para tal, 2 g de amostra foram transferidas para um erlenmeyer com 100 mL de água destilada, onde foram adicionados 5 mL de HCl 100 %. A solução foi autoclavada a uma temperatura de 121 °C por 20 min. Após a autoclavagem, a solução foi neutralizada com NaOH até pH 7,0. A solução foi filtrada para balão de 250 mL e avolumada com água destilada. A partir dessa solução, transferiu-se 1 mL para balão de 50 mL e foram quantificados os açúcares redutores pelo método de 3,5-DNS, conforme Miller (1959).

O malte submetido à sacarificação apresentou 53,63 % de amido, enquanto que o substrato apresentava 66,93 % de amido. Os grãos de substrato (milho não maltado) foram moídos em blender até a granulometria de 60 mesh e hidratados por 15 horas com água acidulada com HCl para o pH 5,0. O material hidratado foi aquecido gradualmente até 100 °C e a temperatura foi mantida por 1 hora, com o objetivo de geleificar ao máximo o amido favorecendo a ação enzimática. A goma coloidal, produto desse processo foi colocada em contato com o malte nas concentrações citadas no PM (Tabela 3). O mosto foi submetido a 6 horas de tratamento sob agitação constante, permanecendo 2 horas a 50 °C e 4 horas a 70 °C. Esta combinação de tempo e temperatura foi selecionada em virtude da termoestabilidade das enzimas do malte (Reguly, 1996). Os hidrolisados obtidos foram caracterizados a cada hora quanto a açúcares redutores por 3,5-DNS (Miller, 1959).

O mosto sacarificado de amido de milho foi filtrado e esterilizado a 120 °C por 20 min. Após atingir temperatura ambiente foi diluído com água estéril até atingir a faixa de 14 °Brix, tendo também o pH ajustado entre 4,5 e 5,0. A fermentação foi conduzida em reatores de 5 L com volume útil de 2 L em estufa com controle de temperatura a 30 °C. A inoculação foi realizada em condições estéreis na concentração de 5 g.L⁻¹ e o microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de fermento comercial liofilizado. As 2 horas iniciais do processo foram aeradas (170 L_{O₂}.h⁻¹) com uma bomba de diafragma, objetivando estimular o crescimento das células. As amostras foram coletadas no tempo zero e a cada 2 horas, para as determinações analíticas até o tempo de 24 horas de fermentação, tempo este que caracterizou a estabilização do consumo de açúcares no processo.

A determinação do pH foi realizada por meio do método potenciométrico (AOAC, 1995), sendo mantido na faixa de 4,5 a 5,0 pela adição de NaOH 1M e HCl 1M. A concentração de biomassa [X] foi determinada por meio da leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 610 nm, utilizando-se uma relação pré-estabelecida entre a biomassa e a absorbância, por meio da curva padrão de biomassa. A curva padrão foi construída pela leitura da absorbância de soluções com diferentes concentrações de biomassa, determinadas pela massa seca. A determinação de açúcares redutores foi quantificada pelo método 3,5-DNS (Miller, 1959). A concentração de etanol foi determinada por meio do método do dicromato de potássio (Salix & Povoh, 1993). A eficiência do processo de fermentação foi calculada com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac ($51,1 \text{ g}_{\text{etanol}}/100\text{g}_{\text{glicose}}$), $E = Y_{P/S} * 100/0,511$, onde $Y_{P/S}$ é o fator de conversão de substrato em produto, expresso em $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{ART}}^{-1}$, e calculado por $Y_{P/S} = \frac{dP}{-dS}$. Foram plotados os dados de produto (P) versus substrato (S), encontrando-se um modelo matemático correspondente (coeficiente de correlação superior a 0,95). A partir desse modelo matemático foi calculado o fator de conversão por meio da derivada de P em relação a S. Os resultados da sacarificação e fermentação foram avaliados por análise de variância e teste de Tuckey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Potencial Amilolítico do Malte

A Tabela 1 apresenta a matriz do PFC 2² e os valores de atividade enzimática das α -amilases e amilases totais ($\text{mg}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$) do malte previamente seco.

Observou-se que em todos os experimentos os valores de atividade enzimática do malte, referentes a amilases totais foram superiores aos valores para α -amilase. De acordo com Reguly (1996), as amilases totais são as principais constituintes do malte, sendo elas compostas pela soma de α -amilases e β -amilases, o que justifica os maiores valores encontrados para amilases totais.

Na Tabela 1, observa-se que a máxima atividade enzimática foi $2538,38 \text{ mg}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$ para α -amilases e $3283,76 \text{ mg}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$ para amilases totais, encontradas para a concentração de substrato 20 % e temperatura de incubação de 70 °C. Segundo Tull et al. (2002) 50 % da atividade enzimática inicial para α -amilases presentes no malte de cevada ocorre após 15 minutos de incubação com elevação da temperatura de 37 °C até 68 °C, sendo rapidamente inativada a 77 °C. Para Nirmala & Muralikrishna (2003), a temperatura de estabilidade para α -amilases vegetais, quando extraídas em solução tampão pH 5,0 situa-se na faixa 30 °C a 75 °C quando incubados por um período de 15 min. A α -amilase é inativada em pH abaixo de 4,0, porém pode ser estável em pH alcalino.

A inativação seletiva da α e β -amilase está relacionada com o decréscimo do pH na extração da enzima, com valor menor de 4,0 para a α -amilase ou tratamento térmico acima de 70 °C (β -amilase), em pH neutro, respectivamente. Segundo Muralikrishna & Nirmala (2004), as enzimas vegetais α -amilases são mais termoestáveis que as β -amilases.

Na análise das amilases totais, considera-se um maior conteúdo de β -amilases, que são as principais enzimas do malte. Segundo Eglinton et al. (1998), que estudou malte de cevada, a termoestabilidade da β -amilase pode apresentar-se em diferentes níveis,

Tabela 1 – Níveis e Valores Reais das variáveis do PFC 2² com 3 pontos centrais e os resultados das atividade das α -amilases e amilases totais.

Experimento	Temperatura de Incubação (X ₁)	Concentração de substrato (X ₂)	α – amilase (mgAR/gmalte)	Amilases totais (mgAR/gmalte)
1	30°C (-1)	10% (-1)	1038,24 ± 29,5	1243,18 ± 8,84
2	70°C (+1)	10% (-1)	2195,55 ± 3,0	2254,83 ± 16,83
3	30°C (-1)	20% (+1)	1022,57 ± 10,8	1682,67 ± 21,80
4	70°C (+1)	20% (+1)	2538,38 ± 0,3	3283,77 ± 38,07
5	50°C (0)	15% (0)	1780,26 ± 24,7	2281,82 ± 22,63
6	50°C (0)	15% (0)	1745,64 ± 28,7	2172,81 ± 6,38
7	50°C (0)	15% (0)	1757,54 ± 29,8	2097,07 ± 27,67

dependendo do grão maltado e das condições de extração da enzima. A inativação térmica pode ocorrer tardiamente quando se encontra em meios com elevadas concentrações de carboidrato e proteína. A β -amilase é a enzima limitante na degradação do amido, porém é mais termolábil quando comparada com a α -amilase presente no malte. Quanto maior a termoestabilidade da enzima mais eficiente será a degradação do amido. O uso de elevada concentração de amido e altas temperaturas aumentam o poder diastático das enzimas do malte. A análise estatística dos resultados do PFC 2² com três pontos centrais foi efetuada através do módulo Experimental Design, do Software Stastitica 6.0, pelo método da análise de variância, utilizando os valores de atividade enzimática ($\text{mg}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$) para as condições do experimento 4, já que os mesmos apresentaram valores superiores para atividade enzimática.

A Tabela 2 apresenta os efeitos e o nível de significância ($p < 0,05$) para os resultados de atividade enzimática das α -amilases e amilases totais em função das variáveis do PFC 2². Na análise tanto de α -amilases quanto amilases totais observa-se que as variáveis X_1 e X_2 , apresentaram efeito positivo sobre a atividade enzimática que aumentou quando se passou do nível inferior para o nível superior do PFC 2², ou seja, a máxima atividade enzimática foi encontrada em níveis superiores de substrato e temperatura de incubação. Observa-se ainda que a interação entre X_1 e X_2 também apresentou

significância ($p < 0,05$) com efeito positivo sobre atividade enzimática das α -amilases e amilases totais. Dessa forma, os valores máximos de atividade enzimática foram obtidos nas condições do experimento 4, ou seja, em temperatura de 70 °C e concentração de substrato de 20 %.

Processo de sacarificação e fermentação alcoólica

Na Tabela 3 mostra-se a matriz do PM, com as variáveis reais e codificadas e os resultados dos açúcares redutores formados no processo de sacarificação do amido, expressos em AR ($\text{g}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$).

Os resultados mostram que a sacarificação atingiu a maior quantidade do amido degradado no experimento 2, com 90 % malte e 10 % de substrato, com $986,55 \text{ g}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$. Farias et al. (2007) mostram que, após um período de 6 horas de sacarificação, ocorre uma redução do potencial sacarificante do malte devido à perda da termoestabilidade das enzimas. A redução da velocidade de hidrólise do amido ocorre em razão das quantidades crescentes de açúcares redutores no meio, repressão conhecida como efeito glicose (Bertolin et al., 2003).

Nas primeiras 2 horas de sacarificação a 50 °C ocorreu à liquefação do mosto com aumento dos terminais redutores, por meio da ação da α -amilase dispondo novas extremidades não redutoras para a atividade da β -amilase. Após 2 horas, a temperatura foi elevada para 70 °C,

Tabela 2 – Efeitos e o nível de significância ($p < 0,05$) para os resultados de atividade enzimática das α -amilases e amilases totais em função das variáveis do PFC 2².

Fonte de variação	α -amilase		Amilases totais	
	P	Efeito	P	Efeito
X_1	0,0001	1336,56	0,0000	1104,85
X_2	0,0113	163,58	0,0001	351,71
$X_1 * X_2$	0,0094	179,25	0,0114	800,97

Tabela 3 – Níveis e Valores Reais das variáveis do PM e os resultados da degradação do amido em AR, em base úmida, no tempo inicial e final (6 h) do processo de sacarificação.

Experimento	Concentração de malte (X_1)	Concentração de substrato (X_2)	AR ($\text{g}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$) Tempo Inicial (0 h)	AR ($\text{g}_{\text{AR}} \cdot \text{g}_{\text{malte}}^{-1}$) Tempo Final (6 h)
1	10 %	90 %	101,59	922,96
2	90 %	10 %	105,86	986,55
3	50 %	50 %	170,45	957,08
4	50 %	50 %	150,48	945,10
5	50 %	50 %	154,06	926,14

umentando novamente a velocidade de formação de extremidades reductoras que caracteriza a sacarificação, pela ação da α -amilase. Esse resultado concorda com Evangelista et al. (2005) que verificaram que as temperaturas ótimas para a atuação das enzimas do malte de milho foram 55 e 75 °C para a β -amilase e α -amilase, respectivamente.

Na Tabela 4, mostram-se os valores de p e a regressão, em nível de 95 % de significância, da predição do modelo ideal para a resposta de concentração de etanol dos experimentos.

Observa-se, na Tabela 4, que o modelo quadrático foi significativo, a 95 % de significância, com p de 0,0035 e coeficiente de determinação de 0,9976. Este resultado mostra que existe uma grande variação entre os resultados de concentração de etanol em função das diferentes quantidades de malte dos experimentos do PM. As maiores proporções de malte conduziram a maiores taxas de degradação do amido, gerando, conseqüentemente, maior taxa de conversão em etanol. Dessa forma, o modelo quadrático representou a predição da condição ótima do PM para otimização das concentrações de substrato e malte utilizadas no processo

de sacarificação. Verificou-se nas condições adotadas que a produção alcoólica foi de aproximadamente 8,27 °GL, para os experimentos com 50 % e 90 % de malte.

Os dados obtidos para as condições de fermentação estudadas no PM foram utilizados para calcular os parâmetros cinéticos. Na Figura 1, apresentam-se os resultados em células (g.L⁻¹), AR (mg.mL⁻¹) e etanol (g.L⁻¹) dos experimentos do PM.

Na Tabela 5 apresentam-se os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{p/S}$), de substrato em células ($Y_{x/S}$), eficiência da fermentação (E) e taxa volumétrica de formação de produto máxima ($Q_{p\text{máx}}$) obtidos na fermentação do malte de milho para obtenção de álcool. Analisando-se a Figura 1 e a Tabela 5 quanto aos parâmetros cinéticos avaliados, pode-se verificar que o experimento 2 e os experimentos centrais apresentaram os melhores resultados de eficiência de fermentação (77,49 e 70,25 %, respectivamente) e fator de conversão de substrato em produto (0,396 e 0,359 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹, respectivamente), características importantes na fermentação alcoólica. No entanto, a taxa volumétrica de formação de produto máxima (2,81 g_{etanol}.L⁻¹.h⁻¹) foi encontrada para as

Tabela 4 – Valores de p (coeficiente estatística) e r² (coeficiente de determinação) para a predição do modelo ideal do Planejamento de Mistura.

Modelo	P	R ²
Linear	0,0965	0,6561
Quadrático	0,0035	0,9976

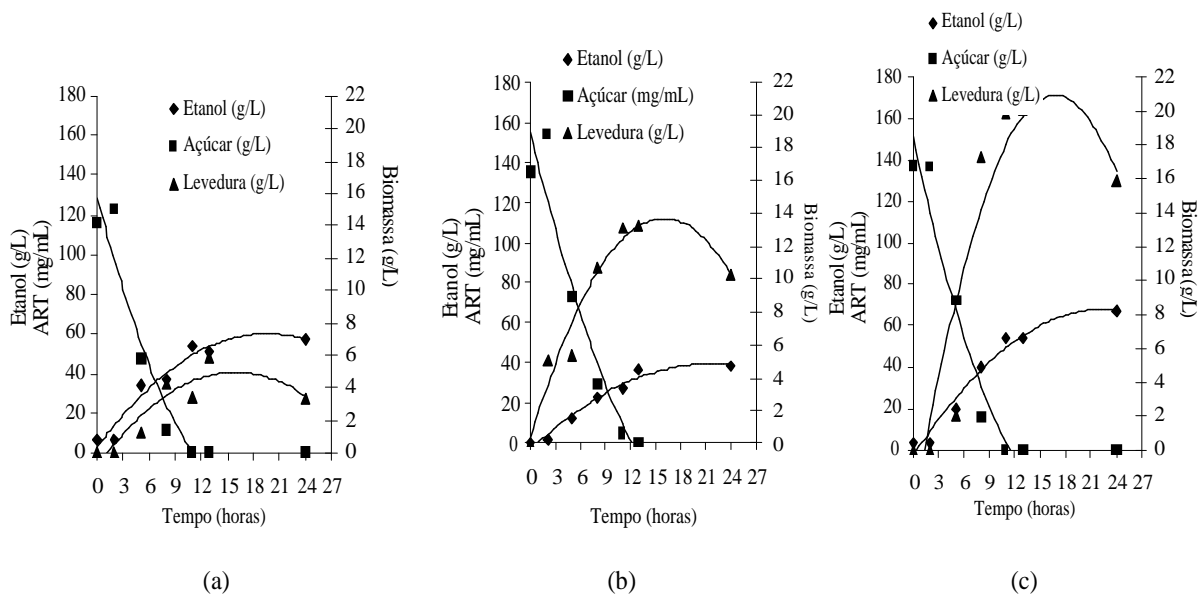


Figura 1 – Parâmetros cinéticos para a condição ótima de fermentação dos experimentos 1 (a), 2 (b) e do ponto central (c).

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos dos experimentos do PM na produção de álcool.

Experimentos	$Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{produto}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)	$Y_{X/S}$ ($\text{g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)	E (%)	$Q_{p \text{ max}}$ ($\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$)
1	0,231	0,089	45,21	1,59
2	0,396	0,027	77,49	2,48
Centrais	0,359	0,137	70,25	2,81

condições dos experimentos centrais. Além disso, com relação ao fator de conversão de substrato em células, os experimentos centrais apresentaram também o maior valor ($0,137 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$). Esses resultados são satisfatórios, uma vez que se busca na fermentação alcoólica maior rendimento em produto (etanol) associado à elevada concentração celular.

O processo de fermentação efetuado com 50 % de malte e 50 % de adjunto (1:1) apresentou os melhores parâmetros cinéticos de taxa volumétrica de formação de produto em etanol ($2,81 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e conversão de substrato em células ($0,127 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$). A proporção (1:1) malte/adjunto, referida para este estudo, estão próximas de relações utilizadas no processo cervejeiro onde variam de 1:1 e 1:2. (Venturini Filho & Cereda, 1998).

CONCLUSÃO

A temperatura de incubação e concentração de substrato foram significativos na determinação do potencial amilolítico do malte de milho. A máxima atividade enzimática foi de 2538,38 mg AR.g malte⁻¹ para α -amilase e 3283,765 mg AR.g malte⁻¹ para amilases totais. Esses resultados foram obtidos para a concentração de substrato de 20 % e temperatura de incubação de 70 °C. O processo de fermentação efetuado com 50 % de malte e 50 % de substrato apresentou os melhores parâmetros cinéticos de taxa volumétrica de formação de etanol ($2,81 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e conversão de substrato em células ($0,127 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$).

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul –FAPERGS (Apoio Financeiro) e CNPq pela concessão de Bolsa PIBIC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBEV. Companhia Brasileira de Bebidas. **Cervejas**: fabricação e ingredientes. Disponível em: <<http://www.ambev.com.br/produtos/cervejas>>. Acesso em: 13 jun. 2005.

ARAGÃO, C. A. et al. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho superdoce com ácido giberélico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.43-48, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington, 1995.

BERTOLIN, T. E. et al. Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. **Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, Naturfosch, v.58c, p.708-712, 2003.

BIAZUS, J.P.M. et al. Optimization of drying process of *Zea Mays* malt to use as alternative source of amylolytic enzymes. **Brazilian Archive of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p.185-190, 2005.

EGLINTON, J.K. et al. Thermostability variation in alleles of barley beta-amylase. **Journal of Cereal Science**, London, v.28, p.301-309, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo do milho**. Disponível em: <<http://www.cnpmembrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>>. Acesso em: 1 maio 2008.

EVANGELISTA, A.F. et al. Produção e estudo do potencial de hidrólise de uma nova fonte de enzimas amilolíticas a partir do malte de milho (*Zea mays*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.17, n.1, p.1-14, 2005.

FARIAS, D. et al. Malteação, sacarificação e obtenção de aguardente de milho. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba, 2007. CD-ROM.

- GEORG-KRAEMER, J.E. et al. Developmental expression of amylases during barley malting. **Journal of Cereal Science**, London, v.33, p.279-288, 2001.
- MILLER, G.L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MINELLA, E. et al. Cevada BR 2: cultivar de cevada cervejeira resistente à mancha-reticular causada por *Pyrenophora teres*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.11, p.2163-2168, 1999.
- MINELLA, E. Safra nacional de cevada cervejeira de 2001. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA PF, RS, 22., 2002, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre, 2002. p.84.
- MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α - amylases- an overview. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.60, p.163-173, 2004.
- NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G. Properties of three purified α -amylases from malted finger millet. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.54, p.43-50, 2003.
- REGULY, J.C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**: fundamentos, matérias primas agrícolas, produtos e processos. Pelotas: UFPel, 1996. v.1, 221p.
- SAUER, I.L. et al. Energia renováveis: ações e perspectivas na Petrobras. **Bahia Análises & Dados**, Salvador, v.16, n.1, p.9-22, jun. 2006.
- SALIX, F.L.M.; POVOH, N.P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcólicas. In: CONGRESSO NACIONAL DASTAB, 5., 1993, Águas de São Pedro, SP. **Anais...** Piracicaba, 1993. p.262-266.
- TULL, D. et al. Enhanced amilolytic activity in germinating barley through synthesis of a bacterial α -amylase. **Journal of Cereal Science**, London, v.37, p.71-80, 2002.
- URIYO, M.; EIGEL, W.E. Duration of kilning treatment on α -amylase, β -amylase and endo-(1,3)- β -D-glucanase activity of malted sorghum (*Sorghum bicolor*). **Process Biochemistry**, London, v.35, p.433-436, 1999.
- VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Hidrolisado de fécula de mandioca como adjundo de malt na fabricação de cerveja: avaliação química e sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.2, 1998.
- ZANIN, G.M. et al. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.84/86, p.1147-1161, 2000.