

Otimização do processo de hidrólise do amido de batata (*Solanum tuberosum L.*) cultivar ágata, utilizando enzimas amilolíticas

A. G. T. MENEZES^{1*}, E. G. T. MENEZES¹ e J. G. L. F. ALVES¹

¹ Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos

*E-mail para contato: alinegtm@msn.com

RESUMO – A batata (*Solanum tuberosum L.*) contém cerca de 70 a 80% de amido em base seca. Pelo alto teor de amido, ela pode ser utilizada em processos fermentativos, para produção de vodca, sendo necessário, entretanto, hidrolisar o amido. O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de hidrólise do amido em relação à concentração de polpa de batata/água, concentração de enzima amiloglicosidase e do tempo de reação. Para isso, foi realizado um delineamento composto central rotacional com um total de 17 tratamentos. As variáveis dependentes analisadas foram a concentração de açúcares redutores (AR) e a eficiência da hidrólise (%). A concentração de α -amilase e seu tempo de reação foram mantidos constantes em 7,5 mL/kg de matéria seca e 2 h. Os resultados demonstraram que a condição ótima para hidrólise foi obtida utilizando pontos máximos para os parâmetros polpa de batata/água (0,1502 g matéria seca/g água), concentração de amiloglicosidase (AMG) (6,5 mL/Kg matéria seca) e tempo (11,04 h). O estudo da otimização da etapa de hidrólise do amido mostrou-se importante para aumentar a produção de açúcares redutores e a eficiência do processo.

1. INTRODUÇÃO

A batata é uma matéria-prima rica em amido, possuindo em média 65% a 85% do peso seco segundo Lajolo e Menezes (2006). De acordo com Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2013) a produção mundial de batatas em 2011 foi de 374,4 milhões de toneladas em uma área de, aproximadamente, 19,2 milhões de hectares. O Brasil responde por 3,53 milhões de toneladas (IBGE, 2013). Segundo o IBGE (2013), Minas Gerais é o maior produtor nacional de batata-inglesa, com 36,04% seguido do Paraná (20,77%), São Paulo (17,68%), Rio Grande do Sul (10,21%), Bahia (6,21) e Goiás (5%).

Na produção de uma bebida como a vodca, utilizando o amido como fonte de carbono, é necessário o processo de hidrólise deste para obtenção de glicose, maltose e outros açúcares assimiláveis. Essa hidrólise pode ocorrer de duas maneiras, usando-se tratamento ácido ou tratamento enzimático, apresentando esse último vantagens por ser mais seletivo, gastar pouca energia e não gerar produtos indesejáveis (Curvelo-Santana; Ehrhardt; Tambourgui, 2010; Delgado; Castro; Vazquez, 2009).

A hidrólise enzimática pode ser realizada por enzimas amilolíticas como a α -amilase e amiloglicosidase em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (causando a gelatinização) e

hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio da α -amilase que é uma enzima que age apenas nas ligações do tipo α -1,4-D-glicosídicas entre as unidades adjacentes de glicose na cadeia linear de amilose (Fennema; Parkin; Damodaran, 2010).

Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por uma enzima desramificante, atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina. O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixa massa molecular como glicose e maltose.

A concentração de enzimas, o tempo e a proporção de polpa são fatores fundamentais na hidrólise de derivados amiláceos, sendo importante encontrar valores ótimos para essas variáveis para uma hidrólise eficiente (Maarel et al., 2002). A metodologia de planejamento experimental juntamente com a análise de superfície de resposta é uma ferramenta poderosa que fornece informações seguras para determinar condições ótimas do processo (Rodrigues; Iemma, 2009).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar o processo de hidrólise enzimática da polpa de batata visando aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Produtos vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras.

2.1. Matéria-prima

A matéria-prima foi composta por tubérculos de batata (*Solanum tuberosum L.*), cultivar Ágata, adquirida no comércio local da cidade de Lavras/MG. As batatas foram, inicialmente, lavadas em água corrente, descascadas manualmente e trituradas em liquidificador industrial (Poli modelo LS-06, Brusque/Brasil). Após a trituração, o lote de material foi homogeneizado e armazenado em sacos plásticos de PVC a -18°C até o momento do uso. As amostras foram preparadas, separadamente, em lotes de 1 kg de batata cada.

2.2. Enzimas amilolíticas

Foram utilizadas duas enzimas amilolíticas, a enzima α -amilase Termamyl 2X, produzida por cepas de *Bacillus licheniformis*, que possui atividade enzimática de 240 KNU-T/g e a enzima amiloglicosidase AMG 300L, produzida por cepas de *Aspergillus niger*, cuja atividade enzimática é de 300 AGU/mL, cedidas pela Romerlabs (Campinas/SP).

2.3. Otimização da hidrólise enzimática

A matéria-prima processada foi acrescida de água nas proporções referentes ao planejamento experimental (Tabela 1) e transferida para os erlenmeyers. O pH foi ajustado para 6,0 e 6,5 utilizando-se NaOH 2N. As amostras foram aquecidas, gradualmente, até 90°C , em banho-maria com agitação de 150 rpm. A temperatura foi mantida por uma hora para a

gelatinização do amido. Após o tempo de gelatinização, a enzima α -amilase (Termamyl 2X) foi adicionada em uma concentração de 7,5 $\mu\text{L/g}$ de massa seca de acordo com metodologia proposta por Pavlak, Abreu-Lima e Carreiro (2011). Os erlenmeyers, contendo as amostras, foram resfriados para 60 °C e, em seguida, foi realizada a etapa de sacarificação.

A etapa de sacarificação foi investigada, realizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), com três variáveis independentes (quantidade de amiloglicosidase, a relação de sólido e líquido e tempo de sacarificação), totalizando 17 tratamentos. As variáveis respostas foram concentração de açúcares redutores e eficiência da hidrólise. Os limites das variáveis estão apresentados na Tabela 1 e são semelhantes aos propostos por Duvernay et. al. (2013). Os resultados foram analisados, utilizando o programa Statistica 8.0 (Statsoft, 2008), considerando-se um nível de significância de 95%.

Tabela 1 Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR

Níveis	Amiloglicosidase ¹ (X ₁)	Tempo (h) (X ₂)	Sólido/líquido ² (X ₃)
-1,68	1,5	0,96	0,0998
-1	2,5	3,00	0,1100
0	4,0	6,00	0,1250
1	5,5	9,00	0,1400
1,68	6,5	11,04	0,1502

¹mL/Kg de massa seca; ² g matéria seca/g água.

Na etapa de sacarificação, o pH foi novamente ajustado nas condições ótimas da enzima amiloglicosidase, entre 4,0 e 4,5, utilizando HCl 2N e a temperatura foi ajustada para 60 °C. Os tempos de cada hidrólise variaram de acordo com planejamento.

Foram retiradas amostras em triplicata no início da gelatinização (tempo 0h), após a liquefação (tempo 3h) e ao final do tempo da sacarificação proposto para cada tratamento. Para inativação das enzimas, as amostras coletadas foram colocadas em banho de gelo por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e os sobrenadantes removidos e armazenados a -18°C para as análises de açúcares redutores.

2.3.1. Análises

2.3.1.1. Açúcares redutores (AR)

As concentrações de AR foram determinadas de acordo com o método DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico), proposto por Miller (1959). Para o cálculo, foram feitas curvas de calibração com glicose.

2.3.1.2. Rendimento teórico da hidrólise

A eficiência do processo foi calculada sobre a quantidade de amido na matéria-prima que entrou no processo. O rendimento teórico da hidrólise ($Y_{teórico}$) do amido foi obtido pela Equação 1,

$$Y_{teórico} = \frac{180.M}{162.V} \quad (1)$$

onde 180 é a massa molecular da glicose (g/mol); 162 é a massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido (g/mol); M é massa de amido (g); V é volume de meio (mL).

Considerando os valores de rendimento teórico foi calculada a eficiência da hidrólise pela seguinte Equação 2:

$$Eficiência da hidrólise (\%) = \left(\frac{Y_{real}}{Y_{teórico}} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde YREAL é o rendimento de açúcares obtido no ensaio (g/L) e YTEÓRICO é o rendimento que seria obtido da hidrólise total da massa de amido (g/L).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Otimização da hidrólise enzimática

Para avaliar a influência das variáveis independentes, concentração de amiloglicosidase (X_1), tempo de hidrólise (X_2) e proporção polpa de batata e água (X_3), sobre as variáveis dependentes: AR e eficiência, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR). Os resultados obtidos, baseando-se nos 17 experimentos laboratoriais, executados aleatoriamente, encontram-se na Tabela 2.

Analisando-se os resultados, verifica-se que os valores de AR e eficiência da hidrólise variaram bastante, de 59 a 128 g/L para AR e de 55,6 a 100% para eficiência. Em relação à AR e eficiência, pode-se notar que os ensaios 12 e 8 apresentaram os maiores valores para AR e eficiência, 128 g/L e 100%, respectivamente. Estes tratamentos possuíam concentrações de 4 e 5,5 mL/Kg de massa seca da enzima amiloglicosidase, tempos de hidrólise de 11,04 e 9 h e proporção sólido/líquido de 0,125 e 0,14 g massa seca/g água, respectivamente. Assim, pode-se notar que baixos valores desses parâmetros provocam menores valores de AR e de eficiência de hidrólise.

Na análise estatística do planejamento, foram avaliados os efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis respostas analisadas. Pela análise estatística, foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menores que 5% ($p < 0,05$). Os termos lineares do modelo matemático estão associados à letra L e os quadráticos à letra Q.

Tabela 2 Resultados experimentais do DCCR expressos em AR (g/L) e Eficiência

Ensaio	Amiloglicosidase	Tempo	Sólido/líquido	AR	Eficiência
--------	------------------	-------	----------------	----	------------

	mL/Kg						(g/L)	(%)
	Cod	ms	Cod	horas	Cod	g/g		
1	-1	2,5	-1	3	-1	0,11	76,3	82
2	1	5,5	-1	3	-1	0,11	78,9	84,7
3	-1	2,5	1	9	-1	0,11	79,6	85,5
4	1	5,5	1	9	-1	0,11	80	85,9
5	-1	2,5	-1	3	1	0,14	91,9	77,6
6	1	5,5	-1	3	1	0,14	65,8	55,5
7	-1	2,5	1	9	1	0,14	95,1	80,3
8	1	5,5	1	9	1	0,14	128,2	100
9	-1,68	1,5	0	6	0	0,125	82,9	78,4
10	1,68	6,5	0	6	0	0,125	73,7	69,6
11	0	4	-1,68	0,96	0	0,125	88,9	84,1
12	0	4	1,68	11,04	0	0,125	128,3	100
13	0	4	0	6	-1,68	0,0998	59,1	69,9
14	0	4	0	6	1,68	0,1502	91,3	71,8
15	0	4	0	6	0	0,125	67,1	63,4
16	0	4	0	6	0	0,125	64,2	60,6
17	0	4	0	6	0	0,125	67,4	63,7

AR- Açúcar redutor

Os resultados da análise estatística, para açúcares redutores (Tabela 3), avaliados a 5% de significância, indicaram que foram significativos os termos linear e quadrático do tempo, o termo linear da proporção sólido/líquido e a interação tempo e proporção sólido/líquido. Como os coeficientes dos termos linear do tempo e da proporção sólido/líquido foram positivos, indicam que um aumento do tempo e da proporção sólido/líquido proporciona aumento na concentração de açúcares redutores no meio. Com relação à interação entre tempo e proporção sólido/líquido, ela foi significativa e positiva.

Ao analisar, estatisticamente, os dados experimentais da eficiência (Tabela 3), a 5% de significância, foram significativos apenas os coeficientes da variável tempo (termos linear e quadrático), que foram positivos, indicando que quanto maior o tempo de hidrólise, maior a eficiência.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para as respostas AR e eficiência estão descritos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente, onde se nota pelo coeficiente de determinação (R^2) que 90,92% da variação experimental observada é explicada para AR e 87,06% da variação experimental é explicada para eficiência. Verifica-se, também, que os valores de F, calculado da regressão, são maiores que os valores de F tabelado a um nível de confiança de 95%. Desta forma, esses resultados indicam um bom ajuste do modelo aos valores experimentais e previstos pelo modelo.

Tabela 3 Coeficientes das regressões para teor de açúcares redutores e eficiência

	AR	p-valor	Eficiência	p-valor
--	----	---------	------------	---------

Média	66,32728	0,000004	62,48395	0,000001
(1)Amiloglicosidase(L)	-0,41374 ^{NS}	0,870632	-1,012695262 ^{NS}	0,604543
Amiloglicosidase(Q)	3,89967 ^{NS}	0,191618	4,368263881 ^{NS}	0,071437
(2)Tempo(L)	9,97680	0,004728	5,769620863	0,017598
Tempo(Q)	14,63735	0,000982	10,75211469	0,001219
(3)Sólido/líquido(L)	8,82685	0,008694	-1,576588314 ^{NS}	0,426560
Sólido/líquido(Q)	2,80225 ^{NS}	0,333551	3,263520074 ^{NS}	0,156792
1L por 2L	7,12695 ^{NS}	0,061139	4,931896335 ^{NS}	0,082927
1L por 3L	0,49163 ^{NS}	0,882183	-0,692007598 ^{NS}	0,784874
2L por 3L	7,64191	0,048231	5,300609789 ^{NS}	0,066342
R ²	90,92		87,06	

*NS= Não significativo a 5% de significância

Tabela 4 Análise de variância para açúcares redutores (AR)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fcalc
Regressão	9	5735,760	637,3066174	7,78
Erro	7	572,946	81,84941631	
Total	16	6308,705		

% variação explicada (R²)= 90,92% F_{9;7;0,05}= 3,68

Tabela 5 Análise de variância para eficiência

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fcalc
Regressão	9	2243,248	249,2497576	5,23
Erro	7	333,273	47,61044985	
Total	16	2576,521		

% variação explicada (R²)= 87,06 % F_{9;7;0,05}= 3,68

A curva de contorno para o teor de açúcares redutores (Figura 1) apresenta os efeitos da proporção sólido/líquido e do tempo sobre AR, com a dosagem enzimática fixada no ponto máximo (6,5 mL/Kg massa seca), com maiores concentrações de açúcares redutores obtidas na região de maior tempo de hidrólise e maior proporção sólido/líquido.

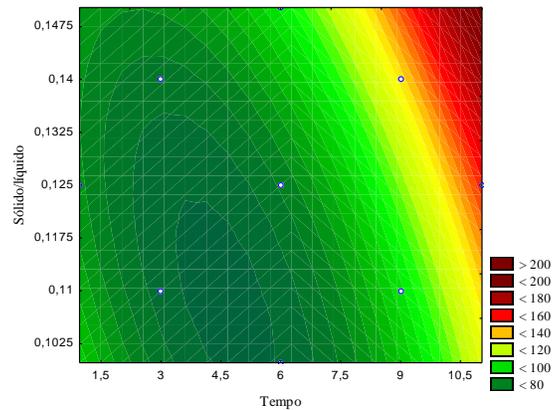


Figura 1 Curva de contorno para o teor de açúcares redutores, sendo a concentração de amiloglicosidase fixada no ponto máximo (6,5 mL/Kg matéria seca).

Na curva de contorno para eficiência do processo de hidrólise (Figura 2), estão apresentados os efeitos da proporção sólido/líquido e do tempo, com a dosagem enzimática fixada no ponto máximo (6,5 mL/Kg massa seca). As maiores eficiências são obtidas na região de elevadas proporções sólido/líquido e maiores tempos de hidrólise. Sendo assim, com base nos resultados das curvas de contorno para açúcares redutores e eficiência, pode-se notar que maiores concentrações de enzimas, proporção sólido/líquido e maior tempo ocasionarão melhores condições de hidrólise, ou seja, maior eficiência na quebra de amido em açúcares.

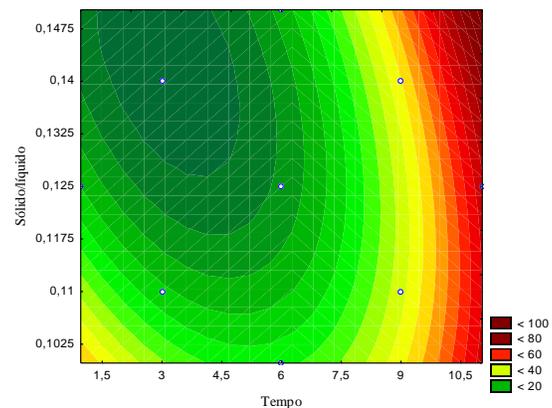


Figura 2 Curva de contorno para eficiência do processo de hidrólise, sendo a concentração de amiloglicosidase fixada no ponto máximo (6,5 mL/Kg matéria seca).

4. CONCLUSÃO

Foram obtidos bons resultados de conversão de amido em açúcares, com concentração de AR de 128 g.L^{-1} e eficiência de hidrólise de 100% usando concentração de amiloglicosidase de

6,5 mL/Kg MS, proporção polpa/água de 0,1502 g MS/g e tempo de hidrólise de 11,04 h. Conclui-se, portanto, que o amido da batata pode ser eficientemente hidrolisado por tratamento enzimático com α -amilase e amiloglicosidase, visando posterior etapa de fermentação alcoólica.

5. REFERÊNCIAS

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

DELGADO, R.; CASTRO, A. J.; VAZQUEZ, M. A kinetic assessment of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*). **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 42, n. 4, p. 797-804, 2009.

DUVERNAY, W. H.; CHINN, S. M.; YENCHO, G. C. Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Industrial Crops and Products**, London, v. 42, p. 527-537, Mar. 2013.

FENNEMA, O. R.; PARKING, L. K.; DAMODARAN, S. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 1999. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20%20RJ/edef/1999_Tabela%20d%20composicao%20de%20alimentos.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2013.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 648, 2006.

MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 94, n. 28, p. 137-155, Mar. 2002.

PAVLAK, M. C. M.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 82-86, nov. 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão, 2009.

STATSOFT. **Statistica**: data analysis software systems. Version 8.0. Tulsa, 2008. Software.