



**ALINE GALVÃO TAVARES MENEZES**

**PRODUÇÃO DE VODCA A PARTIR DE  
BATATA (*Solanum tuberosum L.*) CULTIVAR  
ÁGATA**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**ALINE GALVÃO TAVARES MENEZES**

**PRODUÇÃO DE VODCA A PARTIR DE BATATA  
(*Solanum tuberosum L.*) CULTIVAR ÁGATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Menezes, Aline Galvão Tavares.

Produção de vodca a partir de batata (*Solanum tuberosum* L.)  
cultivar ágata / Aline Galvão Tavares Menezes. – Lavras : UFLA,  
2014.

131 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

Bibliografia.

1. Batata. 2. Amiloglicosidase. 3. Hidrólise enzimática. 4.  
Fermentação. 5.  $\alpha$ -amilase. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD – 663.5

**ALINE GALVÃO TAVARES MENEZES**

**PRODUÇÃO DE VODCA A PARTIR DE BATATA  
(*Solanum tuberosum L.*) CULTIVAR ÁGATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2014.

Dr. Ernandes Benedito Pereira                      Unifal

Dra. Olga Lúcia Mondragón Bernal              UFLA

---

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves  
Orientador

**LAVRAS – MG**

2014

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades que me foram dadas na vida e por me fornecer sabedoria e perseverança suficiente para passar os obstáculos em meu caminho me guiando sempre na direção certa.

Aos meus pais queridos, Helena e Hugo, que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as decisões importantes da minha vida. À minha mãe, pelo apoio, amor incondicional e por ter acreditado em mim mesmo quando eu não acreditava e, ao meu pai, pelo carinho imenso e por estar presente sempre que necessário nas horas mais difíceis.

Ao meu irmão Evandro, com quem aprendi o verdadeiro significado da palavra amizade e companheirismo, obrigada pelos longos dias e noites na UFLA, sem você nada disso seria possível.

Ao professor Dr. José Guilherme, pela confiança em meu trabalho, por todos os conhecimentos transferidos e pela amizade.

Ao programa de Coordenação de Apoio a Pesquisa (CAPES), pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de aprimoramento profissional.

Ao Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente do Departamento de Química, em especial à Professora Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Cardoso e à analista Cleusa de Fatima e Silva pela disponibilidade em realizar as análises necessárias.

Às empresas Romerlabs e LNF Latino Americana por, gentilmente, ceder as enzimas e leveduras utilizadas neste trabalho.

Às amigas Iris, Tallyta e Jéssica pelos momentos de descontração fora da Universidade.

Ao Lucas, por ter se tornado um grande amigo e estar sempre disposto a ajudar.

Ao pessoal do laboratório, Camila, Bruna, Carmem, Michelle, Daiane e Bruno por tanto terem me ajudado e pela amizade formada.

À Mariliana, minha irmã de orientação, pela companhia em dias difíceis, amizade e pela grande ajuda em todos os momentos.

Aos professores Dr. Ernandes Benedito Pereira e Dra. Olga Lúcia Mondragón Bernal, por terem se disponibilizado a participar da defesa da dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, em especial, Tina, Helô, Denise e Creusa, pela ajuda constante, durante as análises e a todos os demais que, de alguma forma, estiveram envolvidos na execução desta pesquisa.

A todos os professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os amigos que conquistei neste caminho, que vão deixar saudades, mas que serão levados comigo por onde for.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade do uso de polpa de batata para produção de vodca, uma bebida alcoólica destiloretificada. A primeira etapa foi a caracterização da polpa de batata, sendo verificada a existência de grande quantidade de amido, o que poderia ser utilizado para obtenção de açúcares para a fermentação alcoólica. A polpa de batata foi submetida a diferentes proporções com água e, em seguida, passou pelo processo de hidrólise enzimática com duas enzimas  $\alpha$ -amilase e diferentes concentrações da enzima amiloglicosidase, variando-se o tempo da segunda etapa de hidrólise. Verificou-se que as maiores concentrações de polpa/água (0,1502 g matéria seca/g água), enzima (6,5 mL/ Kg matéria seca) e tempo (11,04 h) a melhor condição de tratamento. O hidrolisado obtido foi utilizado para fermentação em dois tratamentos, primeiro contendo apenas meio hidrolisado com 11 °Brix e o segundo contendo meio hidrolisado acrescido de sacarose com 17 °Brix. Para os dois tratamentos foram testadas três linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, fermento biológico de panificação prensado, CA11 e CAT1. Foi selecionado o fermento biológico, em virtude do maior fator de conversão (0,47 g etanol/g ART), eficiência (89,39%) e produtividade em etanol (5,92 g/L.h). Foram realizadas duas destilações consecutivas, a primeira em destilador de cobre e a segunda em coluna de vidro, o destilado alcoólico final foi diluído com água purificada para a concentração alcoólica estabelecida (36 a 57% v/v) e foi submetido à filtração em carvão ativado comercial. Análises de compostos secundários foram realizadas no destilado filtrado. As análises demonstraram que a bebida não se enquadrava na legislação estabelecida, possuindo maior valor do somatório de compostos secundários (148,33 mg/100 mL álcool anidro) e maior concentração de metanol (35,04 mg/100 mL álcool anidro), enquadrando na legislação por não apresentar cobre e pelo teor alcoólico de 39,71% v/v.

Palavras-chave: Batata. Amiloglicosidase. Hidrólise enzimática. Fermentação.  $\alpha$ -amilase

## GENERAL ABSTRACT

This study was performed with the objective of evaluating the feasibility of using potato pulp for the production of vodka, a distill-rectified alcoholic beverage. The first stage was characterizing the potato pulp, verifying the presence of large amounts of starch, which could be used for obtaining sugars for the alcoholic fermentation. The potato pulp was submitted to different proportions with water and, later, underwent an enzymatic process with two  $\alpha$ -amylase enzymes and amyloglucosidase enzyme in different concentrations, varying the time of the second stage of hydrolysis. We verified that the highest concentrations of pulp/water (0.1502 g dry matter/g water), enzyme (6.5 mL/kg of dry matter) and time (11.04 h) resulted in the best treatment condition. The hydrolyzate obtained was used for fermentation into two treatments, first containing only hydrolyzed medium with 11 °Brix and the second hydrolyzed medium supplemented with sucrose with 17 °Brix. For both treatments we tested three strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, baking pressed yeast, CA11 and CAT1. The yeast was selected due to the higher conversion factor (0.47 g ethanol / g ART), efficiency (89.39 %) and ethanol productivity (5.92 g/Lh). Two consecutive distillations were performed, the first in copper distiller and the second in a glass column. The final alcoholic distillate was diluted with purified water to set the alcohol concentration (36.57% v/v) and was submitted to filtration through commercial activated carbon. Secondary analyzes were performed on the filtered distillate. The analyses showed that the beverage did not fit the established legislation, presenting higher secondary compound sum value (148.33 mg/100 mL anhydrous alcohol) and higher concentration of methanol (35.04 mg/100 mL anhydrous alcohol), fitting the legislation for not presenting copper and for the alcohol content of 39.71 % v/v.

Keywords: Potato. Amyloglucosidase. Enzymatic hydrolysis. Fermentation.  $\alpha$ -amylase.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Participação de mercado das bebidas destiladas no Brasil .....	18
Figura 2	Estrutura química da molécula de amilose .....	25
Figura 3	Estrutura química da molécula de amilopectina .....	25

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 1

Figura 1	Evolução de açúcares redutores (AR) ao longo dos tratamentos 1 (0,092 g/g), 2 (0,125 g/g) e 3 (0,142 g/g) .....	61
Figura 2	Evolução de açúcares redutores totais (ART) ao longo dos tratamentos 1 (0,092 g/g), 2 (0,125 g/g) e 3 (0,142 g/g) .....	62
Figura 3	Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para resposta açúcares redutores .....	71
Figura 4	Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para resposta eficiência .....	72
Figura 5	Curvas de contorno para teor de açúcares redutores ( $\text{g.L}^{-1}$ ) para hidrólise da batata: .....	74
Figura 6	Curvas de contorno para eficiência (%) da hidrólise da batata .....	76

#### ARTIGO 2

Figura 1	Consumo de açúcares redutores durante a fermentação do hidrolisado de batata por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T1) .....	101
Figura 2	Consumo de açúcares redutores totais durante a fermentação do hidrolisado de batata por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T1) .....	102

Figura 3	Consumo de açúcares redutores durante a fermentação do hidrolisado de batata acrescido de sacarose batata por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T2) .....	103
Figura 4	Consumo de açúcares redutores totais durante a fermentação do hidrolisado de batata acrescido de sacarose batata por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T2) .....	103
Figura 5	Gráfico da concentração de glicose durante a fermentação do hidrolisado de batata por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T1) .....	106
Figura 6	Gráfico da concentração de glicose durante a fermentação do hidrolisado de batata acrescido de sacarose por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T2) .....	107
Figura 7	Evolução do pH durante a fermentação de meio contendo hidrolisado de batata por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T1) .....	109
Figura 8	Evolução do pH durante a fermentação de meio contendo hidrolisado de batata + sacarose por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T2) .....	109
Figura 9	Produção de etanol considerando o meio hidrolisado de batata por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T1) .....	114
Figura 10	Produção de etanol considerando o meio hidrolisado de batata + sacarose por linhagens de <i>S. cerevisiae</i> (T2) .....	114

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR.....	56
Tabela 2	Composição centesimal média de batata ágata em % de matéria seca.....	59
Tabela 3	Eficiência da hidrólise enzimática.....	63
Tabela 4	Resultados experimentais do DCCR expressos em AR (g/L) e Eficiência.....	66
Tabela 5	Coefficientes das regressões para teor de açúcares redutores e eficiência.....	69
Tabela 6	Análise de variância para açúcares redutores (AR).....	70
Tabela 7	Análise de variância para eficiência.....	70

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 2

Tabela 1	Contagem de células viáveis para o tratamento 1, sendo os valores expressos em $10^8$ células/mL.....	111
Tabela 2	Contagem de células viáveis para o tratamento 2, sendo os valores expressos em $10^8$ células/mL.....	112
Tabela 3	Fator de conversão $Y_p/s$ , eficiência fermentativa e produtividade em etanol para tratamento 1.....	116
Tabela 4	Fator de conversão $Y_p/s$ , eficiência fermentativa e produtividade em etanol para tratamento 2.....	116
Tabela 5	Análises físico-químicas da vodca filtrada em carvão ativado.....	120

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1	<b>Bebidas alcoólicas</b> .....	16
2.2	<b>Bebidas destilo-retificadas</b> .....	16
2.2.1	<b>Vodca</b> .....	16
2.3	<b>Legislação Brasileira</b> .....	18
2.4	<b>Produção de etanol de matéria prima amilácea</b> .....	20
2.4.1	<b>Batata</b> .....	21
2.4.2	<b>Importância socioeconômica</b> .....	22
2.4.3	<b>Cultivar Ágata</b> .....	23
2.4.4	<b>Amido</b> .....	23
2.4.5	<b>Gelatinização</b> .....	26
2.4.6	<b>Hidrólise</b> .....	27
2.4.7	<b>Enzimas</b> .....	28
2.5	<b>Fermentação alcoólica</b> .....	29
2.5.1	<b>Microrganismos fermentadores</b> .....	30
2.6	<b>Destilação</b> .....	31
2.7	<b>Filtração</b> .....	33
2.8	<b>Compostos secundários</b> .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38
	<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGOS</b> .....	45
	<b>ARTIGO 1 Otimização do processo de hidrólise do amido de batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.) cultivar ágata, utilizando enzimas amilolíticas</b> .....	45
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	47
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
2.1	<b>Matéria-Prima</b> .....	50
2.2	<b>Preparo da matéria-prima</b> .....	50
2.3	<b>Enzimas amilolíticas</b> .....	51
2.4	<b>Caracterização matéria-prima</b> .....	51
2.4.1	<b>Umidade</b> .....	51
2.4.2	<b>Extrato etéreo</b> .....	51
2.4.3	<b>Cinza</b> .....	52
2.4.4	<b>Fibra alimentar</b> .....	52
2.4.5	<b>Proteína</b> .....	52
2.4.6	<b>Amido</b> .....	52

2.4.7	Pectina total e solúvel.....	53
2.4.8	Açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART) .....	54
2.5	Pré-teste da hidrólise .....	54
2.6	Otimização da hidrólise enzimática.....	55
2.6.1	Pré-sacarificação.....	55
2.6.2	Sacarificação .....	56
2.6.3	Análises .....	57
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	59
3.1	Composição centesimal batata .....	59
3.2	Pré-teste da hidrólise .....	61
3.2.1	Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) .....	61
3.3	Otimização da hidrólise enzimática.....	65
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
	<b>ARTIGO 2</b> Produção de vodca a partir de batata ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) cultivar ágata, utilizando diferentes isolados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	85
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	87
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	90
2.1	Substrato e enzimas .....	90
2.2	Hidrólise enzimática .....	90
2.3	Fermentação.....	91
2.3.1	Microrganismo.....	91
2.3.2	Preparo do inóculo.....	91
2.3.3	Condução do processo fermentativo .....	92
2.4	Análises físico-químicas .....	92
2.4.1	Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) .....	92
2.4.2	Determinação de glicose .....	93
2.4.3	pH .....	93
2.4.4	Contagem de células viáveis em câmara de Neubauer .....	93
2.4.5	Teor alcoólico.....	94
2.4.6	Conversão do substrato em etanol ( $Y_p/s$ ), eficiência fermentativa ( $E_f$ ) e produtividade em etanol.....	94
2.5	Destilação .....	96
2.6	Filtração .....	97
2.7	Compostos secundários.....	97
2.8	Análises estatísticas.....	100
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	101
3.1	Fermentação.....	101
3.1.1	Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) .....	101
3.1.2	Concentração de glicose.....	106
3.1.3	Potencial hidrogeniônico (pH).....	108

<b>3.1.4</b>	<b>Contagem de células .....</b>	<b>110</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Teor alcoólico.....</b>	<b>113</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Conversão do substrato em etanol (<math>\bar{Y}_p/s</math>), eficiência fermentativa (<math>E_f</math>) e produtividade em etanol.....</b>	<b>116</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Destilação e teor de compostos secundários .....</b>	<b>119</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>123</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>130</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

No Brasil, a bebida alcoólica é definida como um produto refrescante, aperitivo ou estimulante destinado à ingestão humana no estado líquido, sem finalidade medicamentosa e contendo mais 0,5% em volume de álcool etílico a 20 °C. É exigido, ainda, que o álcool etílico seja potável e obtido por fermentação ou por destilo-retificação de mosto fermentado (BRASIL, 1997).

As bebidas alcoólicas sempre ocuparam lugar de destaque nas mais diversas civilizações. De acordo com a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), o mercado de bebidas no Brasil possui um faturamento de R\$ 8 bilhões anuais, dos quais R\$ 2 bilhões correspondem a bebidas alcoólicas destiladas. O setor responde por 60 mil empregos diretos e outros 240 mil empregos indiretos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS - ABRABE, 2014).

A vodca é uma bebida destilo-retificada, tradicionalmente é mais consumida em países com clima frio, porém, seu consumo no Brasil tem crescido de forma bastante expressiva. A vodca é, entre os destilados, a bebida mais consumida no mundo, sua produção anual no Brasil ultrapassou os 25 milhões de litros em 2002 com perspectivas de expansão no mercado internacional e brasileiro (ABRABE, 2014).

As matérias primas tradicionais para a sua produção são os cereais, especialmente milho e trigo (LACHENMEIER; SCHMIDT; BRETSCHNEIDER, 2008). Outras matérias primas podem ser também, encontradas nos rótulos dos frascos, como a batata, melão ou beterraba (LACHENMEIER et al., 2003).

O estado de Minas Gerais é líder na produção de batata no Brasil, destacando-se como principais regiões o Alto do Paranaíba e o sul do estado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012). Estima-se que do total da produção de batata, 20 a 28% são desclassificadas, para o comércio ou rejeitadas na colheita, por falta de tamanho adequado, ou por apresentarem defeitos externos ou danos mecânicos.

Uma das alternativas de aproveitamento dessas perdas e do excedente de produção poderia ser a utilização de batatas para produção de vodca. Aliado ao conhecimento do processo de hidrólise enzimática dos amidos em açúcares fermentescíveis, poderia se obter um processo acessível, propiciando, assim, a transformação desta matéria-prima em uma bebida destilada como a vodca, de maior valor agregado.

Objetivou-se neste trabalho estudar o processo de produção de vodca baseando-se na batata cultivar ágata, como alternativa de aproveitamento de perdas e excedentes de produção.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Bebidas alcoólicas**

As bebidas alcoólicas são classificadas, segundo a legislação brasileira em: fermentadas (cerveja e vinho), por misturas (licor, amargo e aperitivo, aguardentes composta e bebidas mistas), destiladas (cachaça, rum, uísque e conhaque) e destilo-retificadas (vodca e gim) (AQUARONE et al., 2001).

### **2.2 Bebidas destilo-retificadas**

As bebidas destilo-retificadas são obtidas do etanol de alta pureza, denominado de álcool etílico potável de origem agrícola. Nessa classe encontra-se a vodca, que é, normalmente, produzida, mediante a diluição deste álcool etílico potável com água, o Gin, Genebra e Steinhager que é o álcool etílico potável odorizado com zimbro. Outras bebidas dessa classe são: Aquavit, odorizada com alcarávia e anis, Corn aromatizada com substâncias naturais de origem vegetal. São bebidas, normalmente, incolores e não passam por envelhecimento (ALCARDE, 2010).

#### **2.2.1 Vodca**

Vodca é uma bebida originária da Polônia e da Rússia, tendo sido desenvolvida, provavelmente, no século XIV. No século XVII, espalhou-se por toda Europa oriental e no século XVIII foi desenvolvido um método de purificação do álcool utilizando carvão oriundo da lenha. Atualmente, é produzida em diversos países do mundo, porém as marcas mais famosas são

produzidas na Europa oriental. É a bebida destilo-retificada mais consumida no mundo (ALCARDE, 2010).

É uma bebida incolor, produzida por fermentação e destilação de cereais, batata, beterraba sacarina, uvas, ou mandioca (LACHENMEIER et al., 2003).

Apenas o etanol produzido de matérias açucaradas ou amiláceas será permitido para consumo humano. Etanol sintético não é permitido para o consumo humano, independentemente do seu grau de purificação (LEGIN et al., 2005).

È uma bebida obtida considerando dois produtos pré-elaborados, o álcool etílico potável de origem agrícola ou destilado alcoólico simples de origem agrícola retificado.

O álcool etílico potável de origem agrícola é o produto com graduação alcoólica mínima de 95% vol., a 20°C, obtido pela destilo-retificação de mosto, proveniente, unicamente, de matéria-prima de origem agrícola, de natureza açucarada ou amilácea, resultante da fermentação alcoólica, como também o produto da retificação de aguardente ou de destilado alcoólico simples. Por sua vez, destilado alcoólico simples de origem agrícola é definido como o produto com graduação alcoólica superior a 54 e inferior a 95% vol., a 20°C, destinado à elaboração de bebida alcoólica e obtido pela destilação simples, ou por destilo-retificação parcial seletiva, de mosto ou subproduto, proveniente unicamente de matéria-prima de origem agrícola de natureza açucarada ou amilácea, resultante da fermentação alcoólica (BRASIL, 2009).

Sua qualidade depende, fundamentalmente, da pureza do álcool potável. Por esse motivo a matéria prima e o processo de fermentação têm menos influência na qualidade da bebida do que o grau de retificação necessário para a obtenção da pureza desejada, o álcool etílico é tratado com carvão ativado para diminuir sua concentração de congêneres e, conseqüentemente, minimizar suas

características sensoriais, como sabor da matéria-prima e cor (ALCARDE, 2010).

Segundo um estudo do panorama atual do mercado de cachaça artesanal, realizado pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE (2012), o mercado de bebidas alcoólicas no Brasil é representado por bebidas destiladas (como cachaça, whisky e vodca) e fermentadas (cerveja e vinho). Em relação ao volume, de um total de 14,9 bilhões de litros, a maior participação é da cerveja (88,9%), seguida pelos destilados (7,5%), ficando o restante do mercado para as demais bebidas (3,6%) (EUROMONITOR, 2013). A vodca representa 5% no mercado de destilados (Figura 1), e este vem crescendo a cada ano, o bom desempenho da vodca no mercado brasileiro advém, principalmente, de seu principal público alvo que são jovens e adultos.

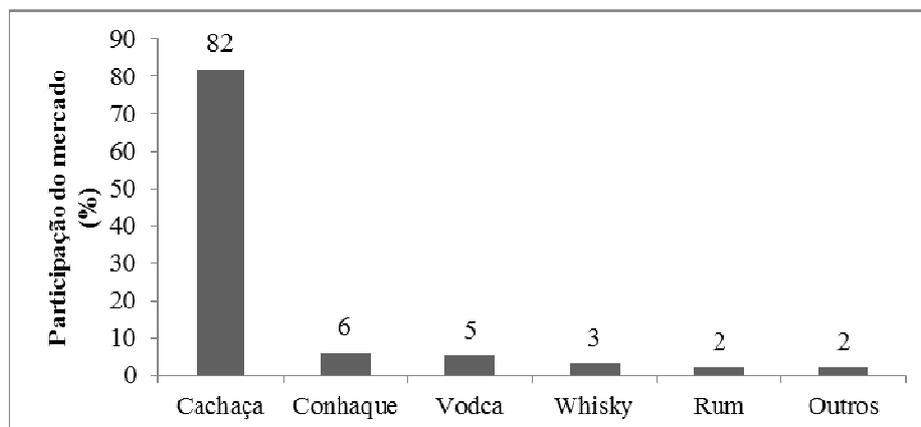


Figura 1 Participação de mercado das bebidas destiladas no Brasil  
Fonte: Euromonitor (2013).

### 2.3 Legislação Brasileira

Segundo instrução normativa nº 78, de 24 de abril de 2008 (BRASIL, 2008), estabelece os padrões de identidade e qualidade para vodca, o

regulamento técnico aplica-se à vodca comercializada em todo o território nacional.

Vodca é a bebida com graduação alcoólica de 36 a 54% em volume, a 20 °C, obtida de álcool etílico potável de origem agrícola, ou destilados alcoólicos simples de origem agrícola retificados, seguidos ou não de filtração, por meio de carvão ativo, como forma de atenuar os caracteres organolépticos da matéria-prima original, podendo ser aromatizada com substâncias naturais de origem vegetal e adicionada de açúcares até 2 g.L<sup>-1</sup>

Será denominada de vodca (vodka ou wodka) a bebida preparada por meio de processo tecnológico adequado que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo ou que tenha sido adicionada de aroma natural que não altere a sua coloração original.

Os ingredientes utilizados na produção da vodca são:

- a) ingredientes básicos - álcool etílico potável de origem agrícola ou destilado alcoólico simples de origem agrícola retificado;
- b) ingredientes opcionais - aroma natural, água e açúcares.
  - a água utilizada deverá obedecer às normas e aos padrões aprovados em legislação específica para água potável e estar condicionada, exclusivamente, à padronização da graduação alcoólica do produto final;
  - o açúcar aqui permitido é a sacarose, a qual poderá ser substituída total ou parcialmente por frutose, maltose, açúcar invertido, glicose e seu xarope;
  - a soma do coeficiente de congêneres (acidez volátil, aldeídos, ésteres, álcoois superiores, expressos pelo somatório dos mesmos, e furfural, todos expressos em miligramas por cem

mililitros de álcool anidro), deverá possuir um valor máximo de 50 mg/ 100mL de álcool anidro;

- o álcool metílico deverá possuir um valor máximo de 20 mg/100mL de álcool anidro;
- concentração de cobre (Cu) não deverá ser superior a 5 mg.L-1 álcool anidro.

#### **2.4 Produção de etanol de matéria prima amilácea**

Matérias amiláceas são viáveis como substratos e poderiam ser utilizadas como potenciais matérias primas para fermentação visando à produção etanol. Isso ocorre pelo enorme valor destes materiais como fonte de carboidratos para processos biotecnológicos, promovidos por microrganismos e/ou enzimas.

A produção de bebidas alcoólicas, com base em matérias-primas ricas em amidos, data de muitos séculos. A escolha da matéria-prima leva em conta a exploração das potencialidades de recursos disponíveis, em cada lugar e os hábitos alimentares de cada região. A Escandinávia utiliza batata e outros cereais para produzir sua Akvavit (aguardente), o saquê, dos orientais, tem na sua composição o arroz, no México, o agave serve de ingrediente para produção da famosa tequila. Em comum, essas bebidas têm o fato de serem originadas de amido (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA - ABAM, 2006).

Segundo Venturini Filho (2005), são necessárias quatro etapas principais para a produção de álcool com base no amido: a geleificação do amido com a posterior sacarificação a açúcares, a fermentação alcoólica e a destilação.

### 2.4.1 Batata

A batata é originária da América do Sul, provavelmente da Cordilheira dos Andes, entre Peru e Bolívia (FILGUEIRA, 2003a). Foi levada para a Espanha em 1570, há relatos de uma segunda introdução, em 1590, na Inglaterra. Após 200 anos ela se tornou um alimento básico na Europa, sendo introduzida em todos os continentes (FILGUEIRA, 2005).

É uma planta dicotiledônea, pertencente à família *Solanaceae*, gênero *Solanum*, que contém mais de 2.000 espécies, incluindo berinjela e tomate, embora pouco mais de 150 sejam produtoras de tubérculos. A batata cultivada no Brasil pertence à espécie *Solanum tuberosum*, que é dividida em duas subespécies, *S. tuberosum ssp. tuberosum* e *S. tuberosum ssp. andigena*, sendo a última cultivada nas regiões andinas. As batatas, hoje em dia, possuem em seu genoma várias características de outras espécies, que são adquiridas por cruzamentos artificiais (LOPES, 2012). Aproximadamente 200 espécies silvestres e 20 cultivadas são conhecidas. A espécie *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* é a mais importante economicamente, cultivada em, pelo menos, 140 países (FORTES; PEREIRA, 2003).

A batateira é uma solanácea anual, herbácea quanto a sua parte aérea. Suas flores são hermafroditas, localizadas na extremidade de um caule aéreo, seu sistema radicular desenvolve-se superficialmente, sendo formado por raízes que se originam na base de uma haste, atingindo profundidade máxima de 30-50 cm, normalmente. A planta apresenta três tipos de caules, as hastes aéreas, clorofiladas; os estólons, subterrâneos que se desenvolvem horizontalmente e os tubérculos que se formam nas extremidades destes, sendo denominados de batata, na qual ocorre o acúmulo de substâncias de reserva (FILGUEIRA, 2003b).

É um dos alimentos mais nutritivos para o homem. Contém proteína de boa qualidade e alto índice de valor biológico. De acordo com a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP (2011), 100 g de batata crua fornecem 64 kcal, sendo composta por 14,7 g de carboidratos, 1,8 g de proteínas, 1,2 g de fibra alimentar, 31,1 mg de vitamina C, 0,6 g de cinzas e 82,9% de umidade, 0,1 mg de tiamina, 1 mg de niacina, 0,02 de riboflavina, 0,4 mg de ferro, 39 mg de fósforo, 302 mg de potássio e 4 g de cálcio.

#### **2.4.2 Importância socioeconômica**

A batata é uma das mais importantes culturas, superada em produção, em termos globais, apenas pelo trigo, milho e pelo arroz. Entre as hortaliças mais cultivadas no mundo, a cultura da batata (*Solanum tuberosum L.*) merece destaque, 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%).

Ainda, de acordo com IBGE (2013), citado pela Secretaria do Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais, entre as regiões de Minas Gerais que detêm a maior produção está o Alto do Paranaíba (47,85%), Sul de Minas (42,06%) e Triângulo (5,39%).

É caracterizada como um alimento popular e mais consumido no mundo em virtude de sua composição, versatilidade gastronômica, tecnológica e baixo preço. Cultivada em mais de 125 países é consumida por um bilhão de pessoas em todo o mundo (ZAMBOLIM, 2011b).

É uma importante fonte de alimento, de emprego rural e de movimentação financeira, a qual contribui para a alimentação e estabilização social do meio rural, principalmente, nos países em desenvolvimento (PEREIRA; LUZ; MOURA, 2005).

### **2.4.3 Cultivar Ágata**

A cultivar Ágata é de origem holandesa, obtida do cruzamento de Böhm 52/72 com Sirco, foi introduzida na Holanda em 1990. Em decorrência de suas características de precocidade, produtividade e excelente apresentação dos tubérculos, em 1999, ano de seu registro no Brasil, integrava a lista de cultivares de nove países europeus. Desde então tem sido a cultivar de mais rápido crescimento em importância da bataticultura brasileira (MELO et al., 2003).

A adoção de cultivares de batata depende da sua adaptação às condições de solo e clima, aos sistemas de produção e ao mercado.

Os tubérculos são graúdos, oval-arredondados, com película amarela áspera e rendilhada, olhos medianamente profundos e polpa branca. Não são indicadas para as preparações industriais de batata frita, pois apresentam baixo teor de matéria seca (FILGUEIRA, 2003b).

### **2.4.4 Amido**

O amido é um típico homopolissacárido de glicose, composto por carbono, hidrogênio e oxigênio na proporção de 6:10:5 de fórmula geral (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>). As unidades de glicose estão ligadas entre si pelo C1 e C4, por meio do oxigênio, formando uma ligação glicosídica. É um dos mais importantes polissacarídeos, utilizados para o armazenamento de energia e é amplamente distribuído em sementes, raízes e tubérculos, bem como em caules, folhas, frutos e até mesmo no pólen (KAUR et al., 2004). Distingue-se entre os

demais carboidratos por ocorrer, na natureza, em partículas denominadas grânulos. É a principal substância de reserva nas plantas superiores, sendo abundante em grãos de cereais (40% a 90% do peso seco), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos (65% a 85% do peso seco) e frutas imaturas ou verdes (40% a 70% do peso seco) (LAJOLO; MENEZES, 2006). Condições ambientais, especialmente a temperatura, exercem um efeito significativo sobre a síntese e propriedades de amidos (ZAMBOLIM, 2011a). Os amidos de diferentes fontes variam na sua composição, qualitativamente e quantitativamente, bem como em algumas das suas propriedades físico-químicas e funcionais (KAUR; SINGH; SINGH, 2004).

Em tubérculos de batata, o amido é o principal polissacarídeo de reserva das plantas; armazenado na forma de grãos nas células da medula e do parênquima cortical, sendo insolúvel em água, pode ser estocado em grandes quantidades (ZAMBOLIM, 2011b). O amido em tubérculos pode variar dependendo da cultivar, da época do cultivo, do estágio de desenvolvimento e do tamanho dos tubérculos entre os diferentes cultivares (ZAMBOLIM, 2011a).

O amido é composto por cadeias de amilose e amilopectina, a amilose é um polímero linear, constituído por unidades de glicose, cada cadeia contém, aproximadamente, 200-700 resíduos de glicose (TESTER; KARKALAS; QI, 2003), com ligações  $\alpha$  -1,4 dando origem à cadeia linear (Figura 2), ocupando cerca de 15-30% do amido, enquanto a amilopectina é presente em maior proporção no amido, com cerca de 70-85% (SRICHUWONG et al., 2005). A amilopectina, além de conter cadeias lineares de glicose  $\alpha$  -1,4, também, contém cadeias de glicose  $\alpha$  -1,6 ligadas formando uma estrutura ramificada (Figura 3) (HANSEN et al., 2008).

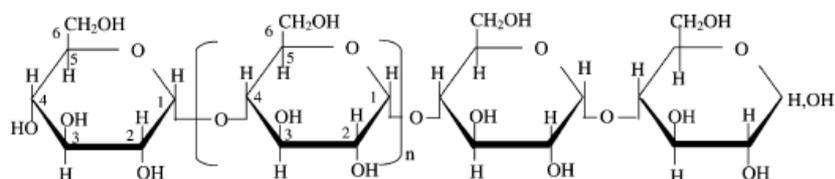


Figura 2 Estrutura química da molécula de amilose  
Fonte Tester, Karkalas e Qi (2003).

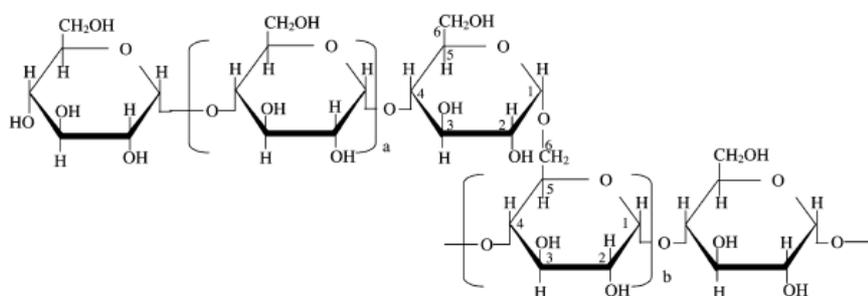


Figura 3 Estrutura química da molécula de amilopectina  
Fonte Tester, Karkalas e Qi (2003).

As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo em uma mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (DENARDIN; SILVA, 2009). De acordo com Stawski (2008), para a batata o conteúdo de amilose é de 26,9%.

O amido é de natureza semicristalina, com diferentes níveis de cristalinidade. A cristalinidade está exclusivamente associada com o componente de amilopectina, enquanto que as regiões amorfas são representadas, principalmente, pela amilose (SINGH et al., 2003).

A digestão do amido pela enzima  $\alpha$ -amilase depende das estruturas cristalinas no amido, teor de amilose, tamanho de grânulo e sua forma, poros de superfície. Entre estes fatores, a estrutura granular é considerada a mais

importante na definição da taxa e extensão da hidrólise enzimática (SRICHUWONG et al., 2005).

#### **2.4.5 Gelatinização**

O fenômeno denominado gelatinização é quando os grânulos são aquecidos em água até uma determinada temperatura, eles incham irreversivelmente ocorrendo a perda da cristalinidade, ocasionando a formação de uma goma viscosa (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010). A gelatinização, geralmente, ocorre em uma ampla faixa de temperatura característica para cada fonte de amido. Nesta temperatura, as ligações de hidrogênio mais fracas entre as cadeias de amilose e amilopectina são rompidas e os grãos de amido, nessas regiões, começam a intumescer e formar soluções, consideravelmente, viscosas (SINGH et al., 2003).

Existem diferenças nas temperaturas de gelatinização entre os amidos, isto pode ser atribuído pelas diferenças no grau de cristalinidade existente em cada. Elevadas temperaturas de gelatinização têm sido relatadas em amido com alto grau de cristalinidade, pois este proporciona estabilidade estrutural e faz com que o grânulo seja mais resistente (BARICHELLO et al., 1990).

Geralmente utiliza-se alta temperatura na gelatinização do amido, ou seja, entre 90 e 120° C, para assegurar a gelatinização completa e uma hidrólise eficiente (SRICHUWONG et al., 2012).

A gelatinização permite que as enzimas penetrem facilmente nas estruturas do amido, contribuindo, assim, para uma reação mais eficiente (HANSEN et al., 2008). As moléculas de amido gelatinizadas são, então, simultaneamente hidrolisadas em dextrinas solúveis, em virtude da ação de enzimas  $\alpha$ -amilase, que serão, ainda, mais hidrolisadas em glicose por amiloglicosidade durante o processo de sacarificação (SRICHUWONG et al., 2012).

#### 2.4.6 Hidrólise

Amido de qualquer fonte pode ser utilizado, para a produção de açúcares fermentescíveis, contendo glicose ou maltose, todos os quais são largamente utilizados nas indústrias de alimentos. Além disso, estes açúcares podem ser fermentados para produzir álcool (UTHUMPORN; ZAIDUL; KARIM, 2010). O amido não está disponível à levedura alcoólica e necessita de uma transformação a açúcares fermentescíveis, que pode ser realizada utilizando hidrólise ácida ou enzimática. Esta etapa é imprescindível para disponibilizar os açúcares redutores requeridos à fermentação (BRINGHENTI; CABELLO, 2005).

Na hidrólise ácida, moléculas de amido são despolimerizadas por ácidos à quente de forma aleatória. Comercialmente, adiciona-se ácido clorídrico diluído ao amido, ou então, trata-se o amido granular umedecido, sob agitação, com gás cloreto de hidrogênio, a mistura é aquecida até que o grau de despolimerização desejado seja atingido (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010). A hidrólise ácida possui a vantagem de necessitar de um menor tempo de sacarificação, porém tem, como desvantagem, problemas como corrosão dos equipamentos, além de gerar uma solução ácida que necessita de uma neutralização, para que possa ser usada para fins de fermentação, também, pode provocar ceta destruição dos açúcares, o que contribui para redução no rendimento do processo (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003). Na hidrólise enzimática, várias enzimas podem ser utilizadas, de origem vegetal ou microbiana, estas vão agir sob as ligações e formar glicose com base no amido, esta tem a vantagem de gerar solução de glicose que pode ser fermentado, sem necessitar de mais tratamentos (DELGADO; CASTRO; VAZQUEZ, 2009).

### 2.4.7 Enzimas

As enzimas são macromoléculas classificadas como proteínas globulares, que atuam como catalisadores biológicos. São denominadas, de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido, que contém dois tipos de polissacarídeos: amilose e amilopectina (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A  $\alpha$ -amilase é uma endoenzima que cliva a molécula de amilose e de amilopectina internamente produzindo oligossacarídeos. Estes podem ter uma, duas ou três ramificações 1-6, uma vez que a enzima age apenas nas ligações do tipo 1,4- $\alpha$ -D-glicosídicas entre as unidades adjacentes de glicose na cadeia linear de amilose. Esta enzima pode ser obtida, baseando-se em vários fungos, leveduras, bactérias e actinomicetos. No entanto, as principais com aplicações na indústria alimentar são de fungos e bactérias. Microrganismos alcalofílicos, em particular espécies de *Bacillus*, como *Bacillus licheniformis*, têm atraído muito interesse nas últimas décadas, isto em razão da sua capacidade de produzir enzimas extracelulares que são estáveis em pH elevado (BAYSAL et al., 2008; FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010).

A enzima amiloglicosidase (glicoamilase) é usada em combinação com a  $\alpha$ -amilase, hidrolisa as unidades de glicose, considerando as extremidades não redutoras das moléculas de amilose e de amilpectina mesmo as que estão ligadas por ligações 1-6. Ela pode hidrolisar por completo o amido à glicose (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010). Ao contrário de uma  $\alpha$ -amilase, a maioria das amiloglicosidases são, também, capazes de hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação da amilopectina (GANGADHARAN et al., 2008). As amiloglicosidases são produzidas por um grupo diversificado de microrganismos, que inclui bactérias, bolores e leveduras, no entanto, para o uso

comercial, as enzimas são produzidas por espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* (NOROUZIAN et al., 2006).

A amiloglicosidase é usada sempre em amidos que foram despolimerizados com  $\alpha$ -amilase, para gerar mais fragmentos e, por consequência, mais extremidades não redutoras (FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010).

## 2.5 Fermentação alcoólica

Do ponto de vista bioquímico, a fermentação é um termo geral que denota a degradação anaeróbia da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos (característicos dos organismos) para obter energia na forma de ATP (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A fermentação é muito utilizada em processos industriais e tem grande importância em diversos setores da economia. Por todo mundo, muitas empresas fabricam produtos obtidos por meio de processos fermentativos, como: ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (BORZANI et al., 2001).

Fermentação alcoólica é o processo de oxidação anaeróbio parcial da glicose, normalmente realizada por leveduras, principalmente, do gênero *Saccharomyces*, por via glicolítica, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato por meio de dez reações catalisadas por diferentes enzimas. As duas moléculas de piruvato, sob condições anaeróbias, são descarboxiladas pela ação da enzima piruvato descarboxilase, formando duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de gás carbônico. As moléculas de acetaldeído são reduzidas a duas moléculas de etanol pela enzima álcool desidrogenase (CAMPBELL, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; VOET; VOET; PRATT, 2000).

O processo fermentativo se inicia assim que a levedura entra em contato com o mosto e é dividido em 3 fases: a fase preliminar ou fase de pré-fermentação, caracterizada pela adaptação das leveduras e pela multiplicação celular; a fase da fermentação principal e tumultuosa com desprendimento abundante de gás e produção de etanol e fase de fermentação complementar ou pós-fermentação, onde se observa a redução brusca na atividade fermentativa (CLETO; MUTTON, 2004).

Para que ocorra uma fermentação vigorosa, é necessário que as exigências da levedura sejam supridas e sejam realizados controles de fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, aeração, nutrientes minerais), orgânicos (inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), já que estes afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; SCHWAN; CASTRO, 2001).

### **2.5.1 Microrganismos fermentadores**

Os principais microrganismos utilizados na produção de etanol correspondem aos fungos (leveduras) e algumas bactérias. As leveduras apresentam-se normalmente sob a forma unicelular e reproduzem-se geralmente por brotamento. Elas crescem mais rapidamente que os bolores e são mais eficientes que estes nas atividades metabólicas. As leveduras, também, diferem das algas, por não realizarem fotossíntese; dos protozoários, por possuírem parede celular rígida; e das bactérias, pelas suas dimensões (maiores) e propriedades morfológicas (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

O gênero *Saccharomyces* é um dos grupos de microrganismos mais estudados pela comunidade científica. Esse interesse é em função da ampla aplicação desses microrganismos na biotecnologia. Essa levedura tem sido relatada como agente de transformação desde 1800 (ANDRIETA et al., 2007). É

considerada um microrganismo seguro (GRAS- generally recognized as safe) e, por essa razão, é cultivada em escala industrial no setor farmacêutico e alimentício há anos (MURPHY; KAVANAGH, 1999).

A habilidade de converter açúcares em etanol é característica de um pequeno grupo de microrganismos, sendo *Saccharomyces cerevisiae*, dentre as leveduras, as que mais se destacam pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol, rápido crescimento, metabolização eficiente de açúcares, habilidade na produção e consumo de etanol, tolerância a baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial (ANDRIETTA et al., 2007; SCHAWAN; CASTRO, 2001).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* necessitam de fonte de carbono elaborada, como glicose ou outro açúcar, que irá fornecer energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares. O meio de cultura deve conter carbono, hidrogênio e oxigênio, além disso deve fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em menor quantidade (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Esses nutrientes influenciam diretamente a multiplicação, o crescimento celular e, também, a eficiência da transformação de açúcar em álcool.

## **2.6 Destilação**

O vinho produzido pela levedura, durante a fermentação, é constituído de água, etanol em maior quantidade e diversos compostos secundários (BOZA; HORII, 1998). Para atender às exigências legais que determina a vodca como uma bebida com graduação alcoólica entre 36 e 54% em volume, o vinho deve

ser destilado com o objetivo de aumentar o teor alcoólico e eliminar esses compostos secundários ao máximo, conferindo qualidade ao produto final.

Segundo Venturini Filho e Mendes (2003), destilação é um processo de separação dos componentes de uma mistura e está baseado na volatilidade de cada um desses componentes, em uma dada temperatura e pressão. Nesse processo a mistura é aquecida até a ebulição, e os vapores são resfriados até sua condensação. Se a mistura é composta por dois líquidos imiscíveis, o destilado será constituído pelo líquido mais volátil.

A destilação é um processo para tornar mais concentrado o álcool presente nos líquidos fermentados. Por meio dela, o líquido fermentado é aquecido até ferver, primeiro o álcool entra em ebulição e o seu vapor, uma vez condensado, forma um líquido de maior concentração alcoólica. É possível o enriquecimento contínuo dos vapores em compostos voláteis, mediante uma sequência de destilações, para isso se utiliza uma coluna de retificação, a qual, além de aumentar a concentração alcoólica, permite, também, a purificação do destilado (ALCARDE, 2010).

Os compostos voláteis destilam segundo três critérios: ponto de ebulição, afinidade com álcool/água e teor alcoólico no vapor, durante a destilação. Em função do grau de volatilidade, o destilado é dividido em três frações: cabeça, coração e cauda (LÉAUTÉ, 1990).

A separação das frações cabeça, coração e cauda, durante a destilação, é de grande importância na produção de bebidas destiladas em alambiques. Ao se separar as frações voláteis, por meio de cortes no destilado, extraem-se os compostos indesejáveis pela cabeça, essa fração corresponde aos primeiros vapores e corresponde de 1 a 10 % do volume total do destilado, essa fração apresenta elevada graduação alcoólica (65-70% de etanol) e é rica em ésteres, aldeídos, metanol, acetato de etila e outros compostos voláteis (CARDOSO, 2013).

A fração coração corresponde ao destilado desejado, e o limite de recolhimento depende do teor alcoólico desejado para o produto final. A fração cauda é, também, denominada de “água fraca”, corresponde a 10% do total a ser destilado, constituída por elementos mais pesados, menos voláteis que o etanol e com maior afinidade pela água, tais como, furfural e álcoois superiores (CARDOSO, 2013).

A destilação pode ser conduzida em alambiques ou destiladores de coluna de vários tipos e tamanhos.

A otimização das condições da operação de destilação é fundamental na obtenção de uma bebida de boa qualidade, pois a destilação além de separar, selecionar e concentrar pelo uso do calor os componentes do vinho, ainda, promove algumas reações químicas induzidas pelo calor. Assim os componentes voláteis presentes, inicialmente, no vinho podem aumentar, diminuir ou, ainda, originar novos componentes (GUYMON, 1974).

Os aparelhos de destilação usados na obtenção de bebidas destiladas são, na maioria, construídos com cobre, isso por possuírem características de ser um metal bem maleável, bom condutor de calor, resistente ao desgaste físico (LÉAUTÉ, 1990).

A dupla destilação é um processo que consiste em realizar duas destilações sucessivas, que podem ser efetuadas em um mesmo alambique ou em alambiques diferentes. A dupla destilação promove a obtenção de uma bebida com qualidade superior às que são obtidas por uma única destilação. A dupla destilação separa compostos indesejáveis, como os aldeídos, metanol, ácido acético, carbamato de etila e outros compostos voláteis que são prejudiciais à qualidade sensorial da bebida e à saúde do consumidor (NOGUEIRA; VENTURI FILHO, 2005).

## **2.7 Filtração**

No processo de produção de vodca, ela é tratada com carvão ativado, para diminuir sua concentração de congêneres e, conseqüentemente, minimizar suas características sensoriais. Esse processo pode ser feito, mediante a dispersão e agitação de carvão ativado na bebida e posterior filtração ou mediante a circulação contínua desta por carvão ativado empacotado em colunas de desodorização.

Os efeitos na redução de congêneres da bebida dependem do tipo de carvão ativado utilizado. Normalmente os produtores utilizam várias colunas de depuração do álcool potável, preenchidas com diferentes tipos de carvão ativados (ALCARDE, 2010).

## **2.8 Compostos secundários**

Durante o processo de fermentação alcoólica, ocorre a quebra dos açúcares contidos no mosto para a formação de álcool etílico e dióxido de carbono. Além desses, há normalmente a presença de pequenas quantidades de outros componentes, os quais recebem a denominação de produtos secundários da fermentação alcoólica (CARDOSO, 2013).

No caso das bebidas destiladas, estes compostos orgânicos são formados por meio de rotas químicas ou bioquímicas durante e após a fermentação alcoólica (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991). As bebidas alcoólicas destiladas contêm um grande número de subprodutos voláteis, tais como, os ésteres, os álcoois, os ácidos graxos, os aldeídos entre outros. O conteúdo e composição desses compostos voláteis dependem das condições de fermentação e destilação, mas, principalmente, do tipo de matérias-primas utilizadas (BRERETON et al., 2003).

Os aldeídos são compostos altamente voláteis e possuem odor penetrante, afetando o aroma das bebidas alcoólicas, são co-produtos normais da

fermentação alcoólica e a formação desse tipo de composto é resultado da ação de leveduras, durante os estágios preliminares do processo fermentativo, formados pela oxidação parcial de álcoois primários, também, podem ser formados pela degradação de aminoácidos ou auto oxidação de ácidos graxos. Por isso um grande número de aldeídos tem sido identificado nas bebidas alcoólicas, mas o principal aldeído relacionado à fermentação alcoólica é o acetaldeído, que representa mais de 90% da concentração total dos aldeídos em bebidas (CARDOSO, 2013; NYKÄNEN, 1983; NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991).

Na constituição de compostos de sabor das bebidas destiladas, os álcoois superiores influenciam, significativamente, nas características do sabor das bebidas. Esses são produtos metabólicos decorrentes do crescimento de leveduras e aproveitamento de aminoácidos como fonte de nitrogênio. Sua formação depende das condições do meio de fermentação, da quantidade e viabilidade do inóculo, da temperatura, do teor alcoólico final do vinho, entre outros fatores (LÉAUTÉ, 1990). O álcool isoamílico é o principal álcool superior formado, durante a fermentação e, dependendo da bebida, pode perfazer 40-70% da fração de álcoois superiores (CARDOSO, 2013).

Os ésteres são resultantes da fermentação, da destilação e do envelhecimento. Estes são responsáveis pelo odor agradável das bebidas envelhecidas (ABBAS, 2006; NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991). São formados pelo metabolismo intracelular das leveduras, durante a fermentação e, em menor escala, por reações de esterificação que ocorre entre álcoois e ácidos carboxílicos durante o envelhecimento da bebida (CARDOSO, 2013).

A maior parte dos ésteres é constituída por ésteres de etila (aproximadamente 80%), formados por reações enzimáticas da levedura, durante a fermentação e destilados junto com o etanol (CARDOSO, 2013).

Os ácidos carboxílicos são compostos normais da fermentação, produzidos pelas leveduras ou bactérias, provenientes de contaminação, eles contribuem para o aroma das bebidas destiladas, em função de seu aroma característico, além de serem fixadores de vários compostos aromáticos. Juntamente com os álcoois superiores confere corpo à bebida (CARDOSO, 2013; LÉAUTÉ, 1990).

Além do ácido acético e láctico, que são subprodutos normais da fermentação alcoólica, também, estão presentes os ácidos fórmico, butírico, propiônico e outros em quantidades menores (CARDOSO, 2013; NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991).

O ácido mais comum e abundante em bebidas destiladas é o ácido acético (NYKÄNEN, 1986). Tal ácido é responsável por 50 a 90% do conteúdo total de ácidos voláteis, sendo formado, principalmente, baseando-se no etanol em uma reação oxidativa, na qual o acetaldeído atua como intermediário (MANFROI, 2010).

A presença de cobre nas bebidas destiladas tem sido um dos problemas na sua produção, pois, desde o início da produção de bebidas fermento-destiladas, o cobre é o material mais utilizado nas construções de alambiques, em virtude das inúmeras vantagens que apresenta como a resistência à corrosão, boa condução de calor, além de reagir com alguns componentes do vinho e atuar como catalisador, em reações altamente favoráveis às características sensoriais da bebida (LÉAUTÉ, 1990).

Durante o processo de destilação, ou durante o tempo em que o alambique não está em uso, há formação de “azinhavre” (carbonato básico de cobre) nas paredes internas. Essa mistura solúvel  $[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$  é dissolvida pelos vapores alcoólicos ácidos, sendo responsável pela contaminação do destilado. A bebida destilada produzida em alambiques de cobre pode provocar

problemas à saúde, quando este elemento ocorre em concentrações elevadas (LIMA-NETO et al., 1994).

Esse elemento tem seu limite máximo estabelecido em  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ , de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Sua concentração pode ser controlada facilmente garantida com higienização correta e constante, por isso, a primeira destilação deve ser feita com água, de modo a eliminar todos os resíduos de cobre e ingredientes utilizados na limpeza (BOZA; HORII, 2000).

O metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , álcool metílico) é um líquido incolor à temperatura ambiente, com um odor suave. É um álcool indesejável nas bebidas, é um material altamente tóxico e inflamável, cuja ingestão ou inalação pode causar cegueira ou até a morte. Originado da degradação da pectina, sua molécula é formada pela associação de centenas de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o processo de fermentação (CARDOSO, 2013; GEROYIANNAKI et al., 2007). Os limites máximos tolerados para o metanol, em bebidas, são fixados pela legislação brasileira em  $20 \text{ mg}/100 \text{ mL}$  de álcool anidro para aguardentes e outras bebidas destiladas e  $0,35 \text{ g.L}^{-1}$  para vinhos (BRASIL, 1974, 1988).

Os açúcares residuais e os compostos sulfatados podem sofrer transformações químicas, durante o aquecimento do vinho, no alambique, afetando a qualidade da bebida, formando compostos indesejáveis como o furfural. A sua formação é evitada pela destilação do vinho limpo, ou seja, livre de substâncias orgânicas em suspensão (CARDOSO, 2013).

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, C. A. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeast. In: QUEROL, A.; FLEET, H. (Ed.). **Yeast in food and beverages**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 285-334.
- ALCARDE, A. R. Bebidas destiloretificadas: vodka e gin. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas alcoólicas**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 1, p. 413-421.
- ANDRIETTA, M. G. S. et al. Bioethanol-30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.
- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 4, 544 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS. **Categorias de mercado**. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/>>. Acesso em: 11 jan. 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA. Química fina. **Mandioca para Beber**, Paranaíba, v. 4, n. 14, jun. 2006. Disponível em: <[http://www.abam.com.br/revista/revista14/mandioca\\_beber.php](http://www.abam.com.br/revista/revista14/mandioca_beber.php)>. Acesso em: 20 set. 2012.
- BARICHELLO, V. et al. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: starch structure and composition. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 4, p. 1054-1059, Aug. 1990.
- BAYSAL, Z. et al. Production of extracellular alkaline  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation with a newly isolated Bacillus sp. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 38, n. 2, p. 184-190, 2008.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 1, 254 p.
- BOZA, T. E. A. G.; HORRI, J. Influência da destilação sobre a composição e qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 391-396, out./dez. 1998.

BOZA, Y.; HORRI, J. Influência do grau alcoólico e acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 279-280, 2000.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 4 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Regulamenta a Lei nº 8918 de 14 de julho de 1994. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 set. 1997. Seção 1, p. 19549.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei 8.918 de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a classificação de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 jun. 2009. Seção 1, p. 20.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova a complementação dos padrões de identidade e qualidade para o vinho, referidos no decreto nº 73.267 de 06-12-1973. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 out. 1988. Seção I, p. 29948.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 371, de 09 de setembro de 1974. Aprova a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas e demais produtos referidos no decreto nº 73.267 de 06-12-1973. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 19 set. 1974. Seção 1, p. 3. Suplemento.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 24 de abril de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2008.

BRERETON, P. et al. Analytical methods for determination of spirit drinks. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 19-25, Jan. 2003.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Engenharia Agrícola**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 36-52, 2005.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2013. 340 p.

CLETO, F. V. G.; MUTTON, M. J. R. Rendimento e composição das aguardentes de cana, laranja e uva com utilização de lecitina no processo fermentativo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 577-584, maio/jun. 2004.

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.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 945-954, maio/jun. 2009.

EUROMONITOR. **Spirits in Brazil**. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/spirits-in-brazil/report>>. Acesso em: 20 set. 2013.

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

FILGUEIRA, F. A. R. Batata inglesa ou andina? **Bata Show**, Itapetinga, v. 5, n. 13, p. 40-41, 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2003a. 333 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Lavras: UFLA, 2003b. 333 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Preliminary 2011 data now available for selected countries and products**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 7 set. 2013.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Classificação e descrição botânica. In: PEREIRA, A.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA Clima Temperado, 2003. p. 69-79.

GANGADHARAN, D. et al. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4597-4602, Nov. 2008.

GEROYIANNAKI, M. et al. Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera L.*). **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 988-995, 2007.

GUYMON, J. F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In: WEBB, A. D. (Ed.). **Chemistry of winemaking**. Washington: Advances in Chemistry, 1974. p. 232-253.

HANSEN, M. R. et al. Gel texture and chain structure of amyloamylase-modified starches compared to gelatin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 1551-1566, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <[http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1361&Itemid=29](http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1361&Itemid=29)>. Acesso em: 7 dez. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2146&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2146&id_pagina=1)>. Acesso em: 10 set. 2012.

KAUR, L.; SINGH, N.; SINGH, J. Factors influencing the properties of hydroxypropylated potato starches. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 55, n. 22, p. 211-223, Jan. 2004.

KAUR, M. et al. Physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of starches separated from kernels of some Indian mango cultivars (*Mangifera indica L.*). **Food Chemistry**, London, v. 85, p. 131-140, Mar. 2004.

LACHENMEIER, D. W. et al. The use of ion chromatography to detect adulteration of vodka and rum. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 105-110, 2003.

LACHENMEIER, D. W.; SCHMIDT, B.; BRETSCHEIDER, T. Rapid and mobile brand authentication of vodka using conductivity measurement. **Microchimica Acta**, Dordrecht, v. 160, n. 1/2, p. 283-289, Jan. 2008.

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

LÉAUTÉ, R. Distillation in alembic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, p. 90-103, 1990.

LEGIN, A. et al. Electronic tongue for quality assessment of ethanol vodka and eau-de-vie. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 534, n. 4, p. 129-135, Apr. 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 839 p.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. p. 11-18. (Biotecnologia Industrial, 3).

LIMA-NETO, B. S. et al. O cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle. **Química Nova**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 220-223, 1994.

LOPES, C. A. **História da batata: cultivo, botânica, pragas e doenças**. Disponível em: <<http://www.batatas.com.br>>. Acesso em: 11 set. 2012.

MANFROI, V. Vinho branco. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 1, p. 143-163.

MELO, P. C. T. de et al. Análise do crescimento da cultivar de batata “Ágata”. **Batata Show**, Itapetininga, v. 3, n. 8, 2003. Disponível em: <[http://www.abbatatabrasileira.com.br/2008/revista.asp?id\\_REVCAT=8&id\\_REVCON=236](http://www.abbatatabrasileira.com.br/2008/revista.asp?id_REVCAT=8&id_REVCON=236)>. Acesso em: 20 set. 2012.

MURPHY, A.; KAVANAGH, K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 7, p. 551-557, Oct. 1999.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2005. 66 p.

NOROUZIAN, D. et al. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 1, p. 80-85, Jan./Feb. 2006.

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, p. 89-96, 1986.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in food and beverages**. New York: M. Dekker, 1991. p. 548-580.

PEREIRA, E. M. S.; LUZ, J. M. Q.; MOURA, C. C. **A batata e seus benefícios nutricionais**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 60 p.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de cana de açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. p. 113-128.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Cachaça artesanal: estudo de mercado SEBRAE**. São Paulo, 2012. Disponível em:  
<[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/444c2683e8debad2d7f38f49e848f449/\\$File/4248.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/444c2683e8debad2d7f38f49e848f449/$File/4248.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2014.

SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, London, v. 81, n. 2, p. 219-231, May 2003.

SRICHUWONG, S. et al. Starches from different botanical sources I: contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 60, n. 4, p. 529-538, 2005.

SRICHUWONG, S. et al. Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 39, p. 120-127, Apr. 2012.

STAWSKI, D. New determination method of amylose content in potato starch. **Food Chemistry**, London, v. 110, p. 777-781, Oct. 2008.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch: composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, London, v. 39, n. 2, p. 151-165, Oct. 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. 4. ed. Campinas, 2011. 113 p.

UTHUMPORN, U.; Z Aidul, I. S. M.; KARIM, A. A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 88, n. 1, p. 47-54, Mar. 2010.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas**: matéria prima, processamento. São Paulo: E. Blucher, 2005. 548 p.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. do P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. (Coord.). **Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosas amiláceas sul americanas**. São Paulo: Fundação Cargil, 2003. v. 3, p. 530-575.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931 p.

ZAMBOLIM, L. **Produção integrada da batata**. Viçosa, MG: UFV, 2011a. 438 p.

ZAMBOLIM, L. **Produção integrada da batata**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2011b. 510 p.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGOS**

**ARTIGO 1** Otimização do processo de hidrólise do amido de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar ágata, utilizando enzimas amilolíticas

**Autores:** Aline Galvão Tavares Menezes, Evandro Galvão Tavares Menezes, José Guilherme Lembi Ferreira Alves

**Artigo formatado de acordo com NBR 6022 (ABNT, 2003)**

## 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, originando assim açúcares fermentescíveis. Objetivou-se neste trabalho otimizar o processo de hidrólise do amido quanto à concentração de polpa de batata/água (0,0998; 0,11; 0,125; 0,14 e 0,1502 g matéria seca/ g água), concentração de enzima amiloglicosidase (1,5; 2,5; 4,0; 5,5; e 6,5 mL/ Kg matéria seca) e do tempo de reação (0,96; 3; 6; 9 e 11,04 horas). Para isso, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 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  $\alpha$ -amilase e seu tempo de reação foram mantidos constantes em 7,5 mL/kg de matéria seca e 2 horas de reação. Os resultados demonstraram que a condição ótima para hidrólise foi obtida utilizando pontos máximos para os parâmetros polpa de batata/água (0,1502g matéria seca/g água), concentração de amiloglicosidase (AMG) (6,5 mL/Kg MS) e tempo (14 horas). 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.

Palavras-chave: Sacarificação. DCCR. Amilase. Amiloglicosidase.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (1999), Minas Gerais é o maior produtor nacional de batata inglesa, com 36,04%. Entre as regiões de Minas Gerais que detêm a maior produção está o Alto do Paranaíba (47,85%), Sul de Minas (42,06%) e Triângulo (5,39%).

A batata é uma matéria-prima rica em amido, possuindo em média 65% a 85% do peso seco segundo Lajolo e Menezes (2006).

Na produção de uma bebida, utilizando o amido como fonte de carbono, é necessário o processo de hidrólise deste para obtenção de glicose, maltose e outros açúcares assimiláveis. A vodca é uma bebida que pode ser obtida de matéria-prima amilácea como a batata (LACHENMEIER et al., 2003).

Contudo, o amido não é diretamente fermentescível, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias. Essa hidrólise pode ocorrer de duas maneiras, usando-se tratamento ácido (que necessita de neutralização posterior para fins de fermentação) e tratamento enzimático, que apresenta vantagens sobre o ácido por ser mais seletivo, gastar pouca energia e não gerar produtos indesejáveis, gerando glicose que pode ser diretamente fermentada sem mais tratamentos (CURVELO-SANTANA; EHRHARDT; TAMBOURGU, 2010; DELGADO; CASTRO; VAZQUEZ, 2009).

A gelatinização do amido deve ocorrer, antes de se iniciar a hidrólise, ela é estimulada a uma temperatura elevada e altera a

conformação da molécula, facilitando a ação das enzimas, assegurando a total hidrólise e eficiente fermentação (SRICHUWONG et al., 2009).

A hidrólise enzimática pode ser realizada por enzimas amilolíticas como a  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amilase que é uma enzima que age apenas nas ligações do tipo 1,4- $\alpha$ -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  $\alpha$ -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).

Muitas condições diferentes desse processo podem ser utilizadas, a metodologia de planejamento experimental juntamente com a análise de superfície de resposta, é uma ferramenta que fornece informações seguras e, assim, é possível determinar condições ótimas do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

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. A matéria-prima foi caracterizada por meio de análises físico-químicas realizadas no Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **2.2 Preparo da matéria-prima**

As batatas foram, inicialmente, lavadas em água corrente, descascadas manualmente e, por último, 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.

### **2.3 Enzimas amilolíticas**

Foram utilizadas duas enzimas amilolíticas, uma endoamilase, que quebra ligações  $\alpha$ -1-4 e uma exoamilase, que quebra ligações  $\alpha$ -1-4 e  $\alpha$ -1-6. A endoamilase usada foi a enzima  $\alpha$ -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).

### **2.4 Caracterização matéria-prima**

A polpa da batata, sem a casca, foi caracterizada pelo teor de umidade, matéria seca, teor de amido e composição centesimal. A metodologia utilizada é descrita a seguir:

#### **2.4.1 Umidade**

A umidade foi determinada, gravimetricamente, após secagem em estufa a 65 °C até peso constante, segundo o método da Association of Official Analytical Chemistry - AOAC (1990).

#### **2.4.2 Extrato etéreo**

A determinação do extrato etéreo foi realizada em extrator Soxhlet, utilizando éter para a extração, segundo o método da AOAC (1990).

### **2.4.3 Cinza**

Foi determinada por incineração em forno mufla a 550 °C, por um período suficiente para queima de toda matéria orgânica, segundo o método da AOAC (2000).

### **2.4.4 Fibra alimentar**

O teor de fibras foi determinado pela hidrólise ácida, seguida de hidrólise alcalina, conforme metodologia da AOAC (1990).

### **2.4.5 Proteína**

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl, segundo AOAC (1990). Para a conversão do nitrogênio em proteína bruta utiliza-se o fator de conversão de 6,25.

### **2.4.6 Amido**

O amido presente na batata foi determinado, segundo método de Somogy adaptado por Nelson (1944), onde foi realizada a extração, pela adição de 0,5 g de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e 1 g de amostra seca em 80 mL de álcool etílico 70 °GL, posteriormente, esta mistura foi levada ao banho-maria por 1 hora e depois permaneceu em repouso por 15 horas. Após o repouso, o resíduo foi lavado e filtrado com cerca de 30 mL de álcool etílico 95 °GL. O resíduo sólido foi utilizado na determinação de amido. Na etapa de hidrólise, o resíduo sólido foi misturado com 80 ml de água destilada, três gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10 %

e autoclavado (120 °C/1 h). Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e, novamente, autoclavado (120 °C/30 min). Após resfriar, as amostras foram neutralizadas (pH 7,0) com NaOH 10 % e 50 % e o volume foi completado para 100 mL com água destilada e filtrado. O desproteínizado foi formado pela mistura de 3 mL de filtrado, 9 mL de água destilada, 1,2 mL hidróxido de bário ( $\text{Ba(OH)}_2$ ) 0,3M e 1,2 mL de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) 5 %. Posteriormente, foi realizada uma nova filtração dessa mistura. Para determinação do amido, uma alíquota de 2 mL do desproteínizado foi retirada, para reação com 1 mL do reativo de Somogyi, também, chamado de reativo cúprico (mistura de 25 mL de reativo A e 1 mL de reativo B). As amostras foram levadas para banho-maria por 20 minutos e imediatamente resfriadas em banho de gelo. Em seguida, foi acrescentado 1 mL do reagente de Nelson, também, chamado de reativo Arsenomolibdico e 6 mL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Cary 50 Probe® da Varian) com comprimento de onda de 510 nm e expressos em g/100 g de amostra em comparação com a curva padrão de glicose.

#### **2.4.7 Pectina total e solúvel**

Foram extraídas segundo a técnica descrita por McCready e McComb (1952) e determinadas, colorimetricamente, segundo Bitter e Muir (1962), sendo os resultados expressos em mg de ácido galacturônico por 100 g de extrato da polpa de batata.

#### **2.4.8 Açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART)**

Os açúcares redutores e redutores totais foram determinados pelo método de Somogyi adaptado por Nelson (1944). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm, com sistema computadorizado.

#### **2.5 Pré-teste da hidrólise**

Com intuito de definir os melhores intervalos de estudo da proporção de polpa/água e dos tempos de tratamento a serem utilizados no planejamento, foi realizado um pré-teste da hidrólise, cujos valores de concentração das enzimas foram fixados. Foram testadas 3 proporções de polpa/água (0,092; 0,125 e 0,142 g matéria seca/g água) e foram retiradas amostras ao longo de 13 horas de tratamento.

A primeira etapa do processo de hidrólise foi realizada com enzima  $\alpha$ -amilase (Termamyl 2X), na proporção de 7,5  $\mu$ L/g de matéria seca (2,25 KNU/g de substrato em base seca) e a segunda com a enzima amiloglicosidase (AMG 300L), na proporção de 4  $\mu$ L/g de matéria seca (1,2 AGU/g de substrato em base seca) (PAVLAK; ABREU-LIMA; CARREIRO, 2011).

Na primeira etapa da hidrólise, a mistura teve o pH corrigido para faixa ótima de atuação da enzima  $\alpha$ -amilase, entre 6,0 e 6,5 utilizando NaOH 2N. A mistura foi, inicialmente, aquecida em banho-maria modelo Tecnal, com agitação a uma temperatura de 90°C, por 1 hora, para gelatinização do amido. Após esse tempo, adicionou-se a enzima  $\alpha$ -amilase na concentração citada acima e incubou-se a mistura por 2 horas

a 90°C. Em seguida, os erlenmeyers, contendo as misturas, foram resfriados e amostras foram retiradas para análises de açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART).

Na segunda etapa, ajustou-se o pH para condições ótimas da enzima amiloglicosidase, entre 4,0 e 4,5 adicionando HCl 2N. Adicionou-se a amiloglicosidase e a mistura foi incubada a 60°C. Amostras foram retiradas a partir de então de 2 em 2 h para determinação das curvas cinéticas de AR e ART. Considerando os dados, pode-se definir o intervalo de tempo e a proporção de polpa/água a serem utilizadas no planejamento.

## **2.6 Otimização da hidrólise enzimática**

### **2.6.1 Pré-sacarificação**

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  $\alpha$ -amilase (Termamyl 2X) foi adicionada em uma concentração de 7,5  $\mu$ 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.

### 2.6.2 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), totalizando 17 tratamentos. As variáveis respostas foram açúcares redutores e eficiência. 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 <sup>1</sup> (X <sub>1</sub> )	Tempo (h) (X <sub>2</sub> )	Sólido/líquido <sup>2</sup> (X <sub>3</sub> )
-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

<sup>1</sup>mL/Kg de massa seca; <sup>2</sup> (g/g) Considerando massa em base seca.

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 nos tempos 0h, 3h e ao final do tempo 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.

### **2.6.3 Análises**

#### **2.6.3.1 Açúcares redutores (AR) açúcares redutores totais (ART)**

As concentrações de AR e ART foram determinadas, de acordo com o método DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico), proposto por Miller (1959). Para análise de ART, as amostras antes de reagirem com o ácido 3,5 dinitrossalicílico, eram hidrolisadas com HCl 2N, em água fervendo por 5 min e, em seguida, resfriadas e neutralizadas com NaOH 2N. As leituras da absorbância das amostras foram efetuadas em espectrofotômetro modelo Fento 700s, a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um branco em que o volume da amostra foi substituído por água destilada. Para o cálculo de AR e ART, foram feitas curvas de calibração com glicose e sacarose, respectivamente.

#### **2.6.3.2 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 (YTEÓRICO) do amido foi obtido pela fórmula (Equação 1) descrita por Santana (2007).

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

Onde:

180: massa molecular da glicose (g/mol)

162: massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido (g/mol)

M: massa de amido (g)

V: volume do biorreator (mL)

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

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

Onde:

YREAL: rendimento de açúcares obtido no ensaio (g/L)

YTEÓRICO: rendimento que seria obtido da hidrólise total da massa de amido (g/L)

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Composição centesimal batata

A composição centesimal da batata ágata, utilizada no presente trabalho, encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 Composição centesimal média de batata ágata em % de matéria seca

Análises	Teores (%)	Literatura (%)	Autores
Amido	77 ± 3,0	72,2	Fernandes et al., 2010
Açúcares redutores	0,57 ± 0,05	0,1	Fernandes et al., 2010
Açúcares redutores totais	1,00 ± 0,09	0,12	Fernandes et al., 2010
Proteína	15,9 ± 0,2	10,52	Taco, 2011
Extrato etéreo	0,78 ± 0,32	Traços	Taco, 2011
Cinza	5,2 ± 0,4	5,6	Fernandes et al., 2010
Fibra bruta	4,89 ± 0,66	2,21	Fernandes et al., 2010
Pectina	3,5 ± 1,7	2,5	Petiti, 1979

A umidade encontrada foi de 85,28%, enquanto, de acordo com a Tabela Brasileira de Composição Química dos Alimentos (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, 2011), as batatas Ágata brasileiras apresentam, em média, 82,9% de umidade. Delgado, Castro e Vázquez (2009) encontraram valor da umidade de 80,35%. Fernandes et al. (2010) encontraram valor de umidade igual a 85,9%, valores estes próximos ao encontrado neste trabalho. De acordo com Andreu e Pereira (2007), a matéria seca é uma característica que depende de vários fatores, como data de plantio, umidade do solo, época

de colheita e idade fisiológica dos tubérculos, afetando, assim, indiretamente o teor de umidade nos tubérculos.

O amido é o carboidrato encontrado em maior quantidade em tubérculos e Braun et al. (2010) encontraram valor de 66,38%. Para açúcares redutores e açúcares redutores totais, estes autores encontraram valores de 0,1% e 0,12%, respectivamente, valores menores aos encontrados neste trabalho, 0,57% de açúcares redutores e 1,0% açúcares redutores totais, respectivamente. Essa variação pode ocorrer entre cultivares, de semestre a semestre e de produtor a produtor, podendo ocorrer, também, em função da temperatura de armazenamento (QUADROS et al., 2010).

Evangelista et al. (2010) observaram teores de proteínas, para a cultivar Ágata de 9,82%, sendo inferior ao encontrado no presente trabalho.

De acordo com Lachman et al. (2005), os teores de proteínas nos tubérculos são afetados por diversos fatores, como diferentes cultivares e entre as culturas da mesma variedade, dependendo da localização, do uso de fertilizantes e da maturidade das culturas.

Quanto ao teor de cinza, o presente trabalho apresentou valor de 5,24%. Fernandes et al. (2010), avaliando tubérculos cultivados na safra de inverno, encontraram teores de cinzas para a cultivar Ágata de 5,6% e Evangelista et al. (2010) encontraram valor de 5,94% de cinza, valores próximos ao obtido neste trabalho.

Em relação ao teor de fibra bruta, valores de 4,2% para batata ágata (FERNANDES et al., 2010) e de 3,44% para batata doce (LEONEL; JACKEY; CEREDA, 1998) foram encontrados na literatura.

Diversos fatores irão interferir na quantidade de nutrientes da composição centesimal do tubérculo de batata, como o clima, tipo de solo e fertilidade, temperaturas, maturidade dos tubérculos, condições ambientais de cada safra, além dos fatores intrínsecos de cada cultivar (MENEZES et al., 1999).

### 3.2 Pré-teste da hidrólise

#### 3.2.1 Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)

Os gráficos do estudo cinético de açúcares redutores e açúcares redutores totais dos três tratamentos (0,092; 0,125 e 0,142 g matéria seca/g água), durante a hidrólise enzimática, podem ser observados nas Figuras 1 e 2 respectivamente, sendo os resultados expressos em gramas de açúcares por litro de meio hidrolisado.

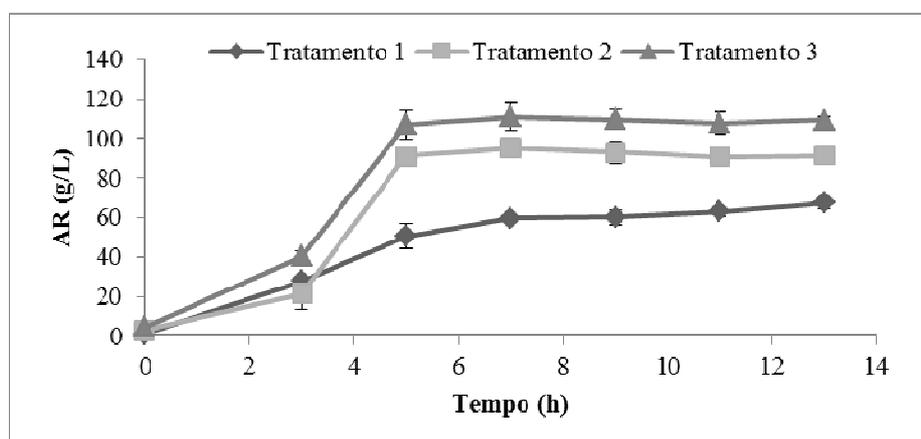


Figura 1 Evolução de açúcares redutores (AR) ao longo dos tratamentos 1 (0,092 g/g), 2 (0,125 g/g) e 3 (0,142 g/g)

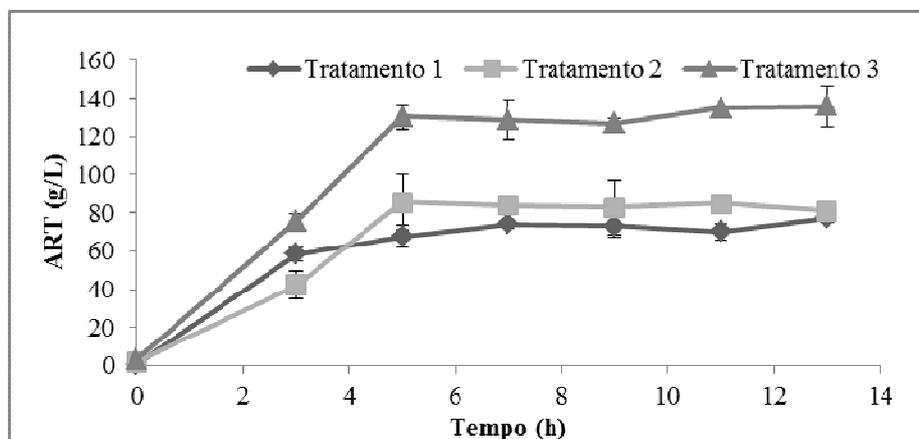


Figura 2 Evolução de açúcares redutores totais (ART) ao longo dos tratamentos 1 (0,092 g/g), 2 (0,125 g/g) e 3 (0,142 g/g)

Para todos os tratamentos, os valores de AR e ART mantiveram-se, aproximadamente, constantes a partir de 7 horas de hidrólise. Os teores de açúcares redutores e redutores totais para o tratamento 1, ao final de 13 h, foram de 67 g AR/L e 77 g ART/L. Para o tratamento 2, os teores máximos de açúcares redutores e redutores totais foram 91 g AR/L e 81 g ART/L ao final do tratamento. Já para o tratamento 3, os teores máximos de açúcares redutores e redutores totais foram 109 g AR/L e 136 g ART/L, respectivamente.

Montesinos e Navarro (2000) estudaram a hidrólise de farinha de trigo adicionada de água (300 g de matéria seca/L), a liquefação realizada por adição de 0,02% (g/kg amido) da amilase Termamyl, a 95 °C durante 2 h. A sacarificação foi conduzida a 60 °C por 6 e 8 horas, adicionando, inicialmente, 0,09 ou 0,18 (%v/m amido) de AMG a pH 4,5. Ao final do processo, foram obtidas concentrações de glicose de 100 e 120 g/L para 6 e 8 horas de sacarificação, respectivamente. Resultados semelhantes

foram obtidos neste trabalho para o tratamento 3, em que foram utilizados 800 g de matéria seca/L água e uma dosagem de  $\alpha$ -amilase de 0,12 % g/kg de amido e de amiloglicosidase de 0,052 % v/m de amido. Após 7 horas obteve-se uma concentração de 109 g/L de açúcares redutores (g/L de glicose equivalente).

Nicolic et al. (2010), utilizando 100g de milho misturado com água em uma proporção de 1:3 adicionou amilase Termamyl®SC na concentração de 0,026% v/m amido e amiloglicosidase SANExtra®L na concentração de 0,156% v/m de amido e obtiveram concentração de açúcares redutores de 150 g/L ao final de 5 horas de hidrólise.

Voca et al. (2009), ao conduzir a hidrólise de amido de milho, após cozido (gelatinizado), durante 30 min, à pressão de 1,5 bar e seco a 130 °C, utilizaram  $\alpha$ -amilase na concentração de 0,2 mL/L e amiloglicosidase na concentração de 0,4 mL/L, obtiveram ao final do processo 105 g de AR/L, resultado semelhante ao obtido neste trabalho para o tratamento 3 (109 g AR/L), quando se utilizou 1 mL amilase/L de meio e 0,4 mL amiloglicosidade /L de meio.

Ao calcular a eficiência da hidrólise enzimática (Tabela 3), foram obtidos resultados superiores a 85%, podendo-se notar que esses valores foram semelhantes para as três concentrações em massa utilizadas. Não houve diferença, estatisticamente, significativa entre eles a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Tabela 3 Eficiência da hidrólise enzimática

	<b>Tratamento 1</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>
<b>Eficiência (%)</b>	85 ± 2	86 ± 1	88 ± 2

Por meio dos resultados apresentados, pode-se concluir que a máxima hidrólise foi obtida no tratamento 3, com maior concentração de batata (0,142 g matéria seca/g água), obtendo-se teores finais de 109 g AR/L e 136 g ART /L e o tempo necessário para a hidrólise completa foi de cerca de 7 horas. A hidrólise, utilizando as enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, foi eficiente, assim, pode-se determinar a faixa experimental a ser investigada no planejamento experimental.

Ao se testar concentrações de polpa/água iguais ou superiores a 0,2 g matéria seca/g água, verificou-se que a mistura tornava-se muito viscosa e de difícil agitação.

Durvenay, Chinn e Yencho (2013) utilizaram uma relação de 12,5% m/v de polpa de batata doce fresca, sendo essa concentração suficiente para coleta do sobrenadante, minimizando problemas de viscosidade. Os mesmos autores utilizaram  $\alpha$ -amilase na proporção de 0,3% m/v matéria seca por 2 horas e amiloglicosidase na proporção de 1,0 AGU / g matéria seca com um tempo de 48 horas. Ao final da hidrólise, obtiveram 316,2 mg de AR/g de amido, resultados estes superiores ao encontrado no presente trabalho, onde foram utilizados 14% m/v de polpa de batata, 0,6% m/v matéria seca de  $\alpha$ -amilase e 1,2 AGU/g matéria seca de amiloglicosidase, obtendo ao final de 13 horas 160 mg AR/ g amido.

Além de fatores como temperatura, pH, agitação e quantidade das enzimas, um fator importante a considerar na hidrólise enzimática é a quantidade de sólido presente no meio reacional. Quando se aumenta a concentração de substrato na etapa de hidrólise, também, ocorre o aumento na concentração de açúcares no meio hidrolisado, entretanto, este aumento de açúcares pode causar uma inibição das enzimas. Outro

fator importante é que o aumento do teor de sólidos, no meio a ser hidrolisado, pode dificultar a transferência de calor e de massa ao longo da hidrólise, em virtude da alta viscosidade do meio (RUDOLF et al., 2005).

### **3.3 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 4.

Tabela 4 Resultados experimentais do DCCR expressos em AR (g/L) e Eficiência

Ensaio	Amilglicosidase		Tempo		Sólido/líquido		AR (g/L)	Eficiência (%)
	Cod	Real	Cod	Real	Cod	Real		
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

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 amilglicosidase, 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. Vários autores utilizaram as enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase em conjunto para hidrólise do amido e obtiveram alto rendimento de açúcares (DELGADO; CASTRO; VÁZQUEZ, 2009; DUVERNAY; CHINN; YENCHO, 2013; UTHUMPORN; KARIM; FAZILAH, 2013).

Lareo et al. (2013), inicialmente, realizaram a gelatinização da batata a 90°C, usando uma proporção de 0,2 g matéria seca/g água. Em seguida, foi feita a hidrólise enzimática da batata adicionando 5,4  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilase g/matéria seca e 5,4  $\mu$ L de amiloglicosidase g/matéria seca durante 3 horas. Ao final do processo, obtiveram concentração de 165 ARg/L.

Leonel e Cereda (1999) estudaram a hidrólise de farelo de mandioca, utilizando uma solução contendo 6% de amido, com 0,5 kg/t amido de  $\alpha$ -amilase e 1,13 L/t de amido de amiloglicosidase, além de enzimas complementares celulase e pectinase com total de 27 horas, obtiveram rendimento de 97%. Resultados este semelhante ao obtido neste trabalho para o ensaio 12, onde se obteve uma eficiência de 100% utilizando uma solução contendo 8,7% de amido, 12 Kg/t amido de  $\alpha$ -amilase e 5,2 L/t amido de amiloglicosidase com total de 11,04 horas.

Collares et al. (2012) obtiveram em seu experimento de hidrólise enzimática de mandioca, eficiência de 98,1%, utilizando 0,5 g matéria seca/g água e 0,8  $\mu$ L/g amido de  $\alpha$ -amilase, 0,84 mg/g amido de amiloglicosidase e 7,05  $\mu$ L de pectinase durante um tempo de 21 horas.

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.

Os resultados da análise estatística, para açúcares redutores (Tabela 6), 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 5), 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.

Tabela 5 Coeficientes das regressões para teor de açúcares redutores e eficiência

	<b>AR</b>	<b>p-valor</b>	<b>Eficiência</b>	<b>p-valor</b>
Média	66,32728	0,000004	62,48395	0,000001
(1)Amiloglicosidase(L)	-0,41374 <sup>NS</sup>	0,870632	-1,012695262 <sup>NS</sup>	0,604543
Amiloglicosidase(Q)	3,89967 <sup>NS</sup>	0,191618	4,368263881 <sup>NS</sup>	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 <sup>NS</sup>	0,426560
Sólido/líquido(Q)	2,80225 <sup>NS</sup>	0,333551	3,263520074 <sup>NS</sup>	0,156792
1L por 2L	7,12695 <sup>NS</sup>	0,061139	4,931896335 <sup>NS</sup>	0,082927
1L por 3L	0,49163 <sup>NS</sup>	0,882183	-0,692007598 <sup>NS</sup>	0,784874
2L por 3L	7,64191	0,048231	5,300609789 <sup>NS</sup>	0,066342
R <sup>2</sup>	90,92		87,06	

\*NS= Não significativo a 5% de significância

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para as respostas AR e eficiência estão descritos nas Tabelas 6 e 7, 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 entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Tabela 6 Análise de variância para açúcares redutores (AR)

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

% variação explicada ( $R^2$ )= 90,92%  $F_{9;7;0,05}= 3,68$

Tabela 7 Análise de variância para eficiência

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

% variação explicada ( $R^2$ )= 87,06,77%  $F_{9;7;0,05}= 3,68$

Foi possível, então, ajustar os modelos com as variáveis codificadas de amiloglicosidase ( $X_1$ ), concentração de polpa e água ( $X_2$ ) e tempo ( $X_3$ ). Os modelos matemáticos empíricos, codificados para as respostas açúcares redutores (AR) e eficiência, com seus respectivos coeficientes, estão apresentados nas Equações 3 e 4, onde os valores em negrito são os parâmetros estatisticamente significativos que foram obtidos utilizando o *software* Statistica® 8.0.

$$\text{AR} = \mathbf{66,33} - 0,41X_1 + 3,89 X_1^2 + \mathbf{9,97X_2} + \mathbf{14,64X_2^2} + \mathbf{8,83 X_3} + 2,80X_3^2 + 7,12 X_1X_2 + 0,49 X_1X_3 + \mathbf{7,64 X_2X_3} \quad (3)$$

$$\text{Eficiência} = \mathbf{62,48} - 1,01X_1 + 4,36 X_1^2 + \mathbf{5,77X_2} + \mathbf{10,75X_2^2} - 1,57X_3 + 23,26X_3^2 + 4,93X_1X_2 - 0,69X_1X_3 + 5,30 X_2X_3 \quad (4)$$

Na Figura 3, é apresentado o gráfico de correlação entre os valores observados, experimentalmente e os valores previstos pelo modelo para AR, observando-se uma boa concordância entre eles como era esperado pelo resultado das análises de variância. Na Figura 4, é apresentado o gráfico correspondente para eficiência da hidrólise, mostrando, também, um bom ajuste dos dados experimentais à equação prevista pelo modelo.

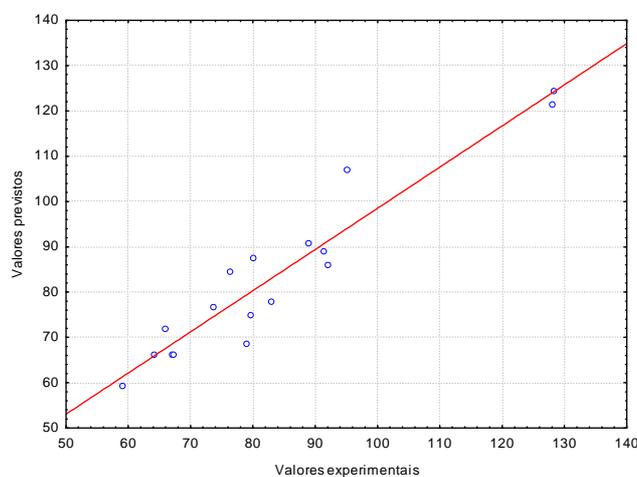


Figura 3 Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para resposta açúcares redutores

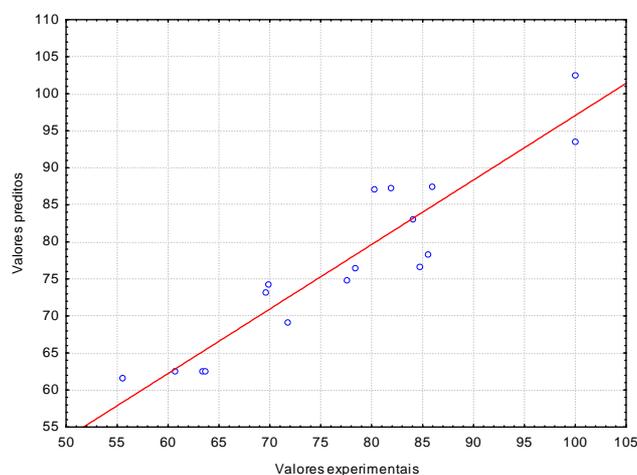


Figura 4 Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para resposta eficiência

As curvas de contorno para o teor de açúcares redutores (Figura 5) foram geradas empregando-se a Equação 3. Na Figura 5A, são apresentados os efeitos da dosagem enzimática (amiloglicosidase) e do tempo de hidrólise, estando a concentração polpa/água fixada em 0,1502 g ms/g água (ponto máximo). Verifica-se que as maiores concentrações de AR são obtidas na região de maior dosagem de amiloglicosidase e de maior tempo de hidrólise. Já na Figura 5B são apresentados os efeitos da dosagem enzimática (amiloglicosidase) e da proporção sólido/líquido, com tempo de hidrólise fixado no ponto máximo (11,04 h). Observa-se que, independente da quantidade de amiloglicosidase dentro da faixa desse estudo, o maior efeito na produção de AR é dado pela maior proporção de polpa/água. Na figura 5C, são apresentados 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.

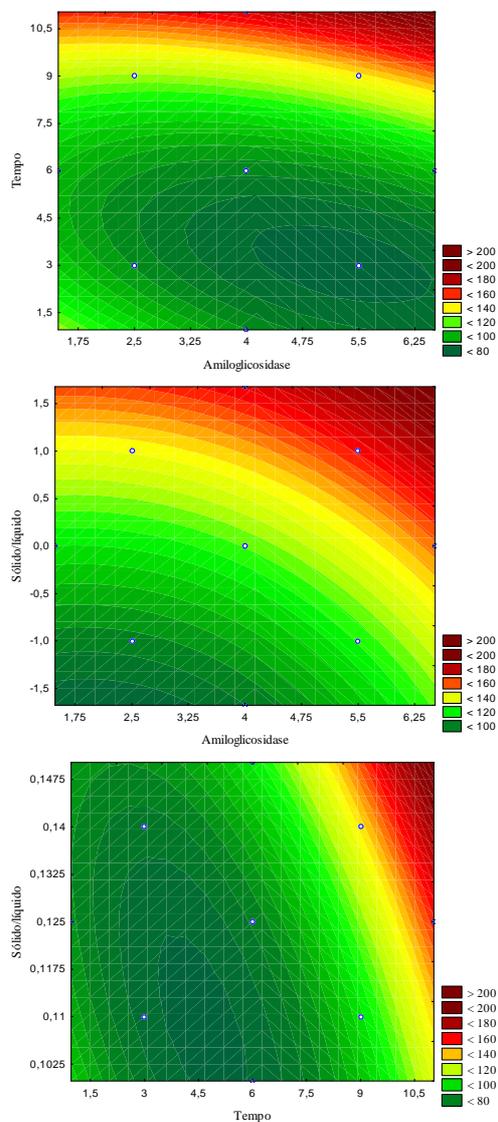


Figura 5 Curvas de contorno para teor de açúcares redutores (g.L<sup>-1</sup>) para hidrólise da batata:

- Amilglicosidase versus tempo, sendo proporção sólido/líquido fixada no ponto máximo (0,1502 g MS/g água).
- Amilglicosidase versus proporção sólido/líquido, sendo tempo fixado no ponto máximo (11,04 h).

- c) Proporção sólido/líquido versus tempo, sendo amiloglicosidase fixada no ponto máximo (6,5 mL/Kg MS).

As curvas de contorno para eficiência do processo de hidrólise são apresentadas na Figura 6. Na Figura 6a, são apresentados os efeitos da dosagem enzimática (amiloglicosidase) e do tempo, estando a proporção polpa/água fixada em 0,1502 g ms/g água (ponto máximo). As maiores eficiências são obtidas com maior tempo de hidrólise e maior teor de enzima. Na Figura 6b, os efeitos da dosagem enzimática (amiloglicosidase) versus proporção sólido/líquido, com o valor de tempo fixado no ponto máximo (11,04 horas) mostraram que as maiores eficiências foram obtidas nos pontos máximos de amiloglicosidase e proporção sólido/líquido. Na Figura 6c, são 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.

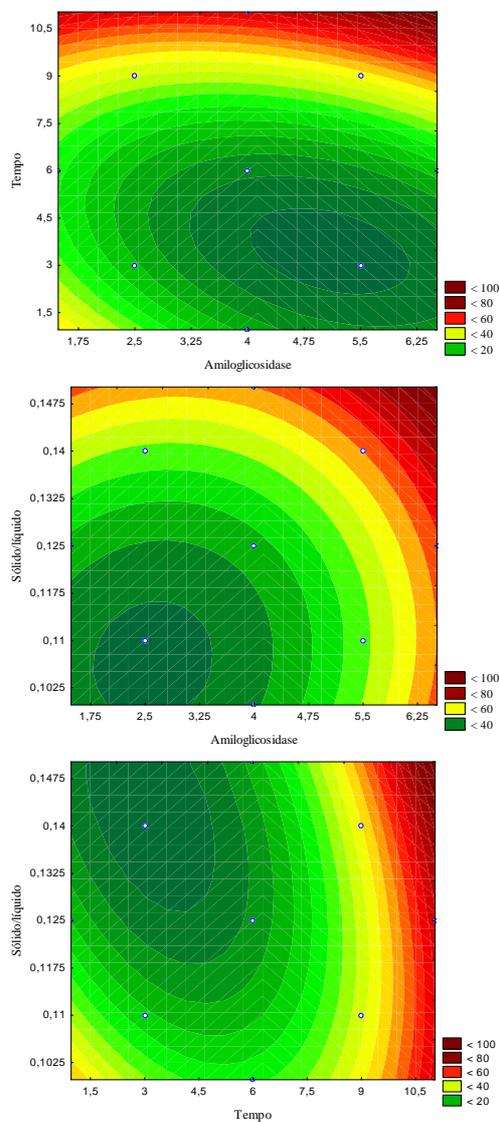


Figura 6 Curvas de contorno para eficiência (%) da hidrólise da batata

- Amiloglicosidase versus tempo, sendo proporção sólido/líquido fixada no ponto máximo (0,1502 g MS/g água).
- Amiloglicosidase versus proporção sólido/líquido, sendo tempo fixado no máximo (11,04 h).
- Proporção sólido/líquido versus tempo, sendo amiloglicosidase fixada no ponto máximo (6,5 mL/kg MS).

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.

## **4 CONCLUSÃO**

Uma vez que foram determinadas as condições ótimas para a hidrólise enzimática do amido da batata, utilizando-se enzimas amilolíticas como a  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase, visando posterior produção de vodca, a composição centesimal da batata ágata demonstrou que é uma matéria-prima de alto teor amiláceo, podendo ser utilizada em processos fermentativos. Foram obtidos bons resultados de conversão de amido em açúcares, com concentração de AR de  $128 \text{ g.L}^{-1}$  e eficiência de hidrólise de 100%. As melhores condições para a hidrólise da polpa de batata foram concentração de amiloglicosidase de  $6,5 \text{ mL/Kg MS}$ , proporção polpa/água de  $0,1502 \text{ g MS/g}$  e tempo de hidrólise de  $11,04 \text{ h}$ .

## **AGRADECIMENTOS**

A CAPES pela bolsa de Mestrado e à empresa Romerlabs, por ceder, gentilmente, as enzimas utilizadas neste estudo.

**Optimization of the hydrolysis process of potato  
(*Solanum tuberosum* L.) starch, agata cultivar, using amylolytic  
enzymes**

**ABSTRACT**

The potato (*Solanum tuberosum* L.) contains about 70 to 80% starch on a dry basis. For its high starch content, it can be used in fermentation processes for the production of vodka, necessitating, however, hydrolyzing the starch, and thus originating fermentable sugars. The objective of this study was to optimize the starch hydrolysis process in regard to the concentration of potato pulp/water (0.0998, 0.11, 0.125, 0.14 and 0.1502 g dry matter/g water), concentration of the amyloglucosidase enzyme (1.5, 2.5, 4.0, 5.5, and 6.5 mL/kg of dry matter) and reaction time (0.96, 3, 6, 9 and 11.04 hours). For this, we used a central composite rotational design (CCRD) with a total of 17 treatments. The analyzed dependent variables were the concentration of reducing sugars (RS) and the hydrolysis efficiency (%). The concentration of  $\alpha$ -amylase and its reaction time were kept constant at 7.5 mL / kg of dry matter and 2 hours of reaction. The results showed that the optimum condition for the hydrolysis was achieved using maximum points for the potato pulp/water parameters (0.1502 g dry matter/g water), amyloglucosidase (AMG) concentration (6.5 ml/kg DM) and time (14 hours). The starch hydrolysis stage optimization study proved to be important in order to increase the production of reducing sugars and the process efficiency.

Keywords: Saccharification. CCRD. Amylase. Amyloglucosidase.

## REFERÊNCIAS

- ANDREU, M. A.; PEREIRA, A. da S. Asociación entre el color de la peridermis de la papa con características de importância industrial. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 67, n. 1, p. 72-77, 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 11<sup>th</sup> ed. Arlington, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, 1990.
- BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 34, n. 4, p. 330-334, 1962.
- BRAUN, H. et al. Carboidratos e matéria seca de tubérculos de cultivares de batata influenciados por doses de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 285-293, mar./abr. 2010.
- COLLARES, R. M. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. **Journal of Zhejiang University-Science B Biomedicine & Biotechnology**, Hangzhou, v. 13, n. 7, p. 579-586, 2012.
- CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGU, 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 sweetpotatoes for productions of fermentable sugars and

ethanol. **Industrial Crops and Products**, London, v. 42, p. 527-537, Mar. 2013.

EVANGELISTA, R. M. et al. Qualidade nutricional e esverdeamento pós-colheita de tubérculos de cultivares de batata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 953-960, ago. 2011.

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

FERNANDES, A. M. et al. Qualidade físico-química e de fritura de tubérculos de cultivares de batata na safra de inverno. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 299-304, jul./set. 2010.

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](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20%20RJ/edef/1999_Tabela%20d%20composicao%20de%20alimentos.pdf)>.  
Acesso em: 17 dez. 2013.

LACHENMEIER, D. W. et al. The use of ion chromatography to detect adulteration of vodka and rum. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 105-110, 2003.

LACHMAN, J. et al. The effect of selected factors on the content of protein and nitrates in potato tubers. **Plant, Soil and Environment**, Beijing, v. 51, n. 10, p. 431-438, 2005.

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

LAREO, C. et al. Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. **SpringerPlus**, Heidelberg, v. 2, p. 493, Sept. 2013.

LEONEL, M.; CEREDA, M. Melhoria do rendimento de hidrólise enzimática para produção de etanol a partir de farelo de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, n. 1/2, p. 111-118, 1999.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M. P. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata-doce: um estudo de caso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, ago./out. 1998.  
Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611998000300016&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611998000300016&script=sci_arttext)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

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

MCCREADY, R. M.; MCCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

MENEZES, C. B. et al. Avaliação de genótipos de batata (*Solanum tuberosum* L.) nas safras “das águas” e de inverno no sul de minas gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 776-783, out./dez. 1999.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MONTESINOS, T.; NAVARRO, J. M. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbiology Technology**, New York, v. 27, n. 6, p. 362-370, Sept. 2000.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, p. 375-380, 1944.

NIKOLIC, S. et al. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 34, p. 1449-1456, Oct. 2010.

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.

QUADROS, D. A. et al. Qualidade de batata para fritura, em função dos níveis de açúcares redutores e não-redutores, durante o armazenamento à temperatura ambiente. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 439-443, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

RUDOLF, A. et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 195-204, July 2005.

SANTANA, N. B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

SRICHUWONG, S. et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 890-898, May 2009.

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO**. 4. ed. Campinas, 2011. 113 p.

UTHUMPORN, U.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A. Defatting improves the hydrolysis of granular starch using a mixture of fungal amylolytic enzymes. **Industrial Crops and Products**, London, v. 43, p. 441-449, May 2013.

VOCA, N. et al. Progress in ethanol production from corn kernel by applying cooking pre-treatment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 2712-2718, Feb. 2009.

**ARTIGO 2** Produção de vodca a partir de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar ágata, utilizando diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*

**Autores:** Aline Galvão Tavares Menezes, Evandro Galvão Tavares Menezes, Lucas Ferreira Rodrigues, José Guilherme Lembi Ferreira Alves, Maria das Graças Cardoso

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a utilização de batata cultivar ágata como substrato para produção de vodca. Os comportamentos de três isolados de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, fermento panificação de panificação, CA11 e CAT1, foram avaliados. Para cada isolado, foram testadas duas concentrações de sólidos solúveis, no meio de fermentação, um contendo apenas meio hidrolisado de batata (11° Brix) e outro contendo meio hidrolisado de batata acrescido de sacarose (17° Brix). As três isolados de leveduras foram avaliadas quanto ao rendimento fermentativo e à produção de etanol. Os melhores resultados foram obtidos usando fermento panificação de panificação, com maior conversão de substrato em produto (0,47g etanol/gART), maior rendimento (91,4%) e maior teor alcoólico (6,05% v/v), utilizando meio com 17 °Brix. A partir dessa levedura e condições do meio, foi feita nova fermentação, o meio fermentado clarificado em centrífuga e, em seguida, foram realizadas duas destilações consecutivas, uma em alambique de cobre e outra em coluna de vidro com recheio de silicone. O destilado foi filtrado em carvão ativado e foram realizadas análises de compostos secundários, seus valores foram comparados com o padrão de identidade e qualidade da vodca estabelecido pela legislação brasileira.

Palavras-chave: Vodca. Fermentação. *Saccharomyces cerevisiae*. Compostos secundários. Destilação.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de bebidas alcoólicas baseia-se na transformação dos açúcares contidos em certas matérias primas, sobretudo, frutas e cereais, em álcool etílico e dióxido de carbono, em virtude da ação de determinadas leveduras que catalisam a reação bioquímica. O produto final pode ser consumido, após tratamento mais simplificado de purificação, como vinho, cervejas, cidras e outros, ou por processos de destilação onde são obtidas a aguardente, uísque, vodca e outras bebidas fermento destiladas.

Dentre as matérias primas açucaradas, existem aquelas que são denominadas diretamente fermentescíveis e as não diretamente fermentescíveis. As primeiras são as que possuem monossacarídeos, como sucos de frutas. As não diretamente fermentescíveis são aquelas que contêm dissacarídeos, como por exemplo, a sacarose presente na cana de açúcar, que fermenta após hidrólise, que ocorre naturalmente pela ação da enzima invertase produzida pelo agente de fermentação, no caso de *Saccharomyces cerevisiae*. Existem, também, materiais que não são fermentescíveis pela levedura, como, por exemplo, materiais lignocelulósicos e amiláceas que necessitam de tratamentos antes de serem disponibilizados para fermentação (LIMA et al., 2001).

Além da formação de álcool etílico e dióxido de carbono, ocorre, também, a formação de pequenas quantidades de outros componentes, que recebem a denominação de compostos secundários da fermentação alcoólica ou congêneres, tais como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e

álcoois superiores, os quais são responsáveis pelas características sensoriais das bebidas alcoólicas. Também podem ser encontrados os chamados contaminantes de bebidas alcoólicas, que podem ser de natureza orgânica (carbamato de etila, metanol, acroleína, entre outros) ou inorgânica (cobre, chumbo, arsênio, entre outros) (CARDOSO, 2013).

Na produção de uma bebida, utilizando-se o amido como fonte de carbono, é necessário normalmente o processo de hidrólise deste para obtenção de glicose, maltose e outros açúcares assimiláveis, uma vez que o amido não é assimilado diretamente pelo metabolismo dos microrganismos em geral.

A vodca é uma bebida que pode ser obtida de matéria prima amilácea como a batata. Possui graduação alcoólica de 36% a 54 % em volume a 20 °C, e é obtida de álcool etílico potável de origem agrícola ou do destilado alcoólico simples de origem agrícola retificados, seguidos ou não de filtração por meio de carvão. Estes procedimentos reduzem as características organolépticas originais da matéria prima utilizada. Ela pode ser adicionada de aromatizantes para dar ao produto características organolépticas especiais (SIŘÍŠŤOVÁ et al., 2012).

As matérias primas tradicionais para a produção de vodca são os cereais, especialmente milho e trigo (LACHENMEIER; SCHMIDT; BRETSCHNEIDER, 2008), mas outras matérias primas podem ser, também, utilizadas, como a batata, melão ou beterraba (LACHENMEIER et al., 2003). A água é outra importante matéria prima, que deve ser purificada, a água é filtrada pelo carvão ativado para absorver materiais orgânicos e inorgânicos indesejáveis . Depois ela é passada por colunas de desionização, que removem outras impurezas

presentes. O álcool retificado e a água desmineralizada são misturados nas proporções corretas (LACHENMEIER et al., 2003; LACHENMEIER; SCHMIDT; BRETSCHNEIDER, 2008).

O passo tecnológico mais importante na produção da vodca clássica é assumido como sendo a sua purificação com carvão ativado. Processos mais simples estão baseados na adsorção de substâncias em carvão ativado envolvendo a agitação de certa quantidade de carvão em uma solução de etanol. O processo é finalizado filtrando as partículas sólidas (SIRÍŠŤOVÁ et al., 2012). Outra possibilidade é a filtração da solução de etanol por uma grande quantidade de carvão ativado, embalado em uma coluna ou em várias colunas em série. A solução flui pelas colunas assegurando um contato suficiente da fase sólida e líquida (KOVALIÓV et al., 2007 apud SIRÍŠŤOVÁ et al., 2012).

A qualidade do produto resultante é verificada não somente por análise sensorial, mas também por uma série de características analíticas, como grau alcoólico, acidez total, teor de ésteres, aldeídos, álcoois superiores, cobre e metanol.

Objetivou-se neste trabalho analisar diferentes isolados de *S. cerevisiae* na produção de vodca considerando a batata, além, de analisar o processo de dupla destilação, a filtração com carvão ativado, para que o produto final atenda às exigências da legislação brasileira quanto ao teor dos compostos secundários.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Substrato e enzimas

Batata ágata foi adquirida do comércio local de Lavras, Minas Gerais. Foi realizada sua lavagem em água corrente, descascada manualmente e triturada em liquidificador industrial (Poli modelo LS-06, Brusque/Brasil). Após a trituração, o lote de material foi homogeneizado e armazenado em sacos plásticos a -18 °C em freezer.

As enzimas utilizadas foram  $\alpha$ -amilase (Termamyl 2X/Novozymes), produzida por cepas de *Bacillus licheniformis*, que possui atividade enzimática de 240 KNU-T/g e a enzima amiloglicosidase (AMG 300L/Novozymes), produzida por cepas de *Aspergillus niger*, cuja atividade enzimática é de 300 AGU/mL fornecidas pela empresa Romerlabs.

### 2.2 Hidrólise enzimática

Para hidrólise do amido, foi utilizado recipiente com capacidade para 3L, usando-se proporção de polpa de 0,1502 g/g (polpa/água). Para primeira etapa da hidrólise, o pH foi ajustado para faixa ótima da enzima  $\alpha$ -amilase, entre 6,0 e 6,5 utilizando NaOH 2N. A mistura foi mantida sob agitação em banho- maria a 90°C por 1h para a completa gelatinização. Após esse período de tempo, a primeira enzima  $\alpha$ -amilase (Termamyl 2X) foi adicionada na proporção de 7,5 mL/Kg de matéria seca e foi mantida sob essa temperatura por 2 h.

Na segunda etapa, o pH foi ajustado para condições ótimas da enzima amiloglicosidase (AMG 300L), entre 4,0 e 4,5 adicionando HCl 2N. Resfriou-se o líquido para 60°C e adicionou-se a enzima na proporção de 6,5 mL/Kg de matéria seca e esta foi mantida por mais 11,04 horas, sob agitação, totalizando 14,04 horas de hidrólise. Ao final do processo o hidrolisado foi filtrado manualmente em tecido organza.

## **2.3 Fermentação**

### **2.3.1 Microrganismo**

Foram testadas três diferentes isolados de leveduras *S. cerevisiae* sendo estes: fermento de panificação comercial da marca Fleischmann, levedura selecionada para produção de aguardente (CA11) e uma levedura selecionada para produção de álcool combustível (CAT1), cedidas pela empresa LNF Latino Americana (Bento Gonçalves/Brasil).

### **2.3.2 Preparo do inóculo**

Com o propósito de reativar as células de leveduras e atingir valores iguais a  $10^8$  células viáveis/mL, foi realizada a reativação, utilizando 5g da levedura liofilizada em 50 mL de água destilada estéril a 38°C e mantida nesta condição durante 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para fermento panificação, porém foram utilizados 10g de fermento para 50 mL de água. Antes da adição do inóculo ao mosto a ser fermentado, foram feitas contagens e testes de viabilidade das leveduras como descrito no item 2.4.4.

### **2.3.3 Condução do processo fermentativo**

Erlenmeyers de 1000 mL com 500 mL de hidrolisado foram autoclavados a 121°C e 1,1 Kgf/cm<sup>2</sup> por 15 min. Foram realizados dois tratamentos, tratamento 1 (T1), somente com polpa de batata hidrolisada a 11 °Brix e o tratamento 2 (T2), onde os sólidos solúveis da polpa hidrolisada foram ajustados para 17 °Brix com sacarose, sendo os tratamentos realizados em triplicata.

Os frascos foram inoculados com 10% do inóculo e mantidos à temperatura de 30 °C em incubadora BOD sem agitação. Para o estudo cinético, foram retiradas amostras do mosto fermentado nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48. Foram realizadas análises de pH, contagem de células viáveis, glicose, açúcares redutores e redutores totais. A cada 4 horas, amostras foram retiradas para análise de teor alcoólico. As amostras foram centrifugadas 3000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi armazenado a -18 °C até serem realizadas as análises, todas realizadas em triplicata.

## **2.4 Análises físico-químicas**

### **2.4.1 Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)**

As concentrações de AR e ART foram determinadas, de acordo com o método DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico), proposto por Miller (1959). As leituras da absorvância das amostras hidrolisadas foram efetuadas em espectrofotômetro modelo Femto 700s, a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um branco em que o volume da amostra

foi substituído por água purificada. Para o cálculo de AR e ART, foram feitas curvas de calibração com glicose e sacarose, respectivamente.

#### **2.4.2 Determinação de glicose**

Para a quantificação da glicose, foram adicionados 10 µL de cada uma das amostras (fermentado) em tubos de ensaio e adicionado 1,0 mL do reagente de cor do kit glicose enzimática líquida da marca Doles. Os tubos foram levados a um banho- maria, a 37 °C, durante 5 minutos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 510 nm.

#### **2.4.3 pH**

A aferição do pH, no mosto de fermentação, foi realizada com potenciômetro digital, calibrado no início do processo da análise. A calibração foi realizada com soluções tampões de pH 4 e 7, respectivamente. As análises foram realizadas de acordo com metodologias recomendadas por Instituto Adolfo Lutz (1985).

#### **2.4.4 Contagem de células viáveis em câmara de Neubauer**

As contagens de células viáveis no mosto foram realizadas em câmara de Neubauer, após diluições adequadas, utilizando a coloração com azul de metileno (0,01% m/v de azul de metileno e 2% m/v de citrato de sódio). Preencheu-se a câmara de Neubauer com a mistura e foi observada no microscópio (LEE; ROBINSON; WANG, 1981). O cálculo em cél/ml foi obtido pela seguinte equação 1:

$$\text{Cel/mL} = (\Sigma nq \times 25 \times fd \times 10^4) / n \quad (1)$$

Onde:

$\Sigma nq$  - Soma algébrica do número de células viáveis contadas nos  $n$  quadriculados.

25 - Número total de quadriculados na câmara.

$fd$  - Fator de diluição utilizado referente ao preparo da amostra com solução de azul de metileno.

$10^4$  - Constante da câmara que se refere ao inverso do volume do quadrante central utilizado para contagem.

$n$  - Número de quadriculados contados, dentre os 25 disponíveis.

#### **2.4.5 Teor alcoólico**

Para análise do teor de etanol, foi feita a destilação das amostras, em microdestilador e foi, então, realizada a medição da densidade do destilado utilizando-se picnômetro. A graduação alcoólica do destilado a 20° C foi obtida utilizando a tabela de conversão de densidade em porcentagem de álcool em volume. O resultado foi expresso em % de álcool em volume (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

#### **2.4.6 Conversão do substrato em etanol ( $Y_p/s$ ), eficiência fermentativa ( $E_f$ ) e produtividade em etanol**

O fator de conversão do substrato em etanol ou rendimento foi calculado em gramas de etanol por gramas de glicose totais consumidos (equação 2).

$$Y_{p/s} = (P_f - P_i) / (S_i - S_f); \quad (2)$$

Onde:

P<sub>f</sub>: concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

P<sub>i</sub>: concentração de etanol no início da fermentação (g etanol/L);

Tratamento 1

S<sub>i</sub>: concentração de açúcares redutores no início da fermentação (g AR/L);

S<sub>f</sub>: concentração de açúcares redutores no final da fermentação (g AR/L).

Tratamento 2

S<sub>i</sub>: concentração de açúcares totais no início da fermentação (g ART/L);

S<sub>f</sub>: concentração de açúcares totais no final da fermentação (g ART/L).

A eficiência fermentativa é a fração do açúcar metabolizado que se converteu em etanol. Foi calculada pela relação entre o rendimento do etanol observado no processo e o rendimento teórico (equação 3).

$$E_f = \left( \frac{Y_{p/s}}{0,511} \right) \times 100 \quad (3)$$

A produtividade em etanol (Q<sub>p</sub>) expressa o teor produzido de etanol em certo intervalo de tempo, quantificada em gramas de etanol por

litro de meio fermentado por hora ( $\text{g L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Foi calculada empregando-se a Equação 4:

$$Q_p = P / t_f \quad (4)$$

Sendo:

P= concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

$t_f$ = tempo final da fermentação (horas).

## 2.5 Destilação

Utilizando as melhores condições obtidas de fermentação (levedura de panificação e tratamento 2), a amostra foi clarificada por centrifugação e destilada em alambique de cobre equipado com termômetro e com sistema de aquecimento a gás com capacidade de 15 litros. O destilado obtido no alambique foi, então, retificado em coluna de vidro com recheio de anéis de silicone. Foi colocado 1L do destilado em um balão de 2 litros de fundo redondo, 10% do destilado inicial foi retirado, que correspondia à fração cabeça, e a fração coração correspondendo a 80% do volume destilado restante. O teor alcoólico final foi ajustado com água purificada e a medida foi realizada com alcoômetro de Gay-Lussac.

O destilado foi armazenado em garrafas de vidro tampadas e mantidas em temperatura ambiente até a etapa de filtração.

## 2.6 Filtração

Foi colocado volume de 500 mL da amostra produzida em béquer, onde foi adicionado carvão ativado em pó comercial (Chemco, lote 10698) na concentração de 26 g.L<sup>-1</sup>. A mistura foi submetida à agitação (150 rpm), à temperatura ambiente por 60 minutos, semelhante ao sugerido por Lima et al. (2006), para filtração de cachaça. Após o tempo, foi feita a filtração, a vácuo, com papel de filtro para eliminação do carvão. A amostra foi acondicionada em garrafa de vidro com tampa e submetida às análises de cobre, acidez volátil, ésteres, dosagem de álcoois superiores, aldeídos, grau alcoólico, furfural e metanol, realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas de aguardente do Departamento de Química da UFLA.

## 2.7 Compostos secundários

A determinação dos compostos secundários da vodca foi realizada no Laboratório de Análises Físico-Químicas de aguardente do Departamento de Química da UFLA, seguindo as especificações estabelecidas pelo Decreto 2314 de 04/09/1997, artigo 91 (MAPA).

- a) Exame organoléptico: Foi realizado mediante a observação da amostra em frascos transparentes em um transluminador de luz branca. Os parâmetros observados são aspecto, coloração, limpidez, presença de corpos estranhos e vazamento.

- b) Teor alcoólico: Foi determinado por densitometria, utilizando o densímetro digital DensiMat Gibertini, sendo o resultado expresso em %v/v.
- c) Análise extrato seco: Foi determinada pelo método gravimétrico do extrato, obtido depois da evaporação lenta em banho-maria a 100° C, durante 3 horas.
- d) Álcoois superiores: A quantidade de total de álcoois superiores foi determinada, por meio de cromatografia gasosa por cromatógrafo modelo 17A Shimadzu. Antes da injeção é adicionado à amostra um padrão interno adequado e, então, 1µL da amostra redestilada em destilador simples foi injetada. A concentração de cada componente em relação ao padrão interno é determinada com base nas áreas ou alturas dos picos obtidos pelo integrador.
- e) Acidez volátil: foi determinada pela extração dos ácidos voláteis, utilizando-se destilador eletrônico da marca Gibertini pela técnica de arraste a vapor d'água. O extrato obtido foi titulado com NaOH 0,1N. Os resultados foram expressos em gramas de ácido composto por 100 mL de álcool anidro.
- f) Aldeídos: Os aldeídos da amostra foram dosados por métodos iodométricos, titulando-se o SO<sub>2</sub> produzido durante a sequência de reações do processo analítico. A quantidade de aldeídos, presentes nas amostras, foi expressa em miligramas de aldeído acético por 100 mL de álcool anidro.
- g) Ésteres: Os ésteres foram determinados por meio de titulação dos ácidos carboxílicos, obtidos por trans-esterificação dos ésteres

presentes nas amostras, a quantidade foi expressa em gramas de acetato de etila por 100 mL de álcool anidro.

- h) Cobre: Foi determinado por meio de medidas espectrofotométricas, em 546 nm na região visível. As quantidades de cobre foram determinadas por comparação das absorvâncias, observadas na amostra de vodca com valores de absorvâncias referentes a uma curva de calibração previamente construída, utilizando-se sulfato de cobre pentaidratado como padrão. A quantidade foi expressa em gramas de cobre por 100 mL de álcool anidro.
- i) Metanol: Foi quantificado por medidas espectrofotométricas, realizadas na região visível (575 nm) e comparadas com valores de absorvâncias estabelecidos por meio de um padrão etanol/metanol, contendo quantidades conhecidas de metanol. A quantidade foi expressa em gramas de metanol por 100 mL de álcool anidro.
- j) Furfural: Baseia-se na reação do furfural com o íon anilínio, proveniente do acetato de anilínio, formando o furfulidenanelina. A amostra deve estar com 50 °GL e o teor alcoólico foi ajustado com álcool 90%. Foi quantificado por medidas espectrofotométricas em 520 nm e comparado com uma curva padrão etanol/furfural contendo quantidades conhecidas de furfural. A dosagem do furfural é feita com o destilado corrigido para 50° GL. A quantidade foi expressa em gramas de furfural por 100 mL de álcool anidro.

## **2.8 Análises estatísticas**

O delineamento experimental, utilizado na etapa de fermentação, foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância pelo programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2010). Para efeito de médias, foi utilizado o teste Tukey, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Fermentação

##### 3.1.1 Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)

Os gráficos das cinéticas de consumo de açúcares redutores e redutores totais durante a fermentação em meio hidrolisado com 11 °Brix (T1) podem ser observados nas Figuras 1 e 2.

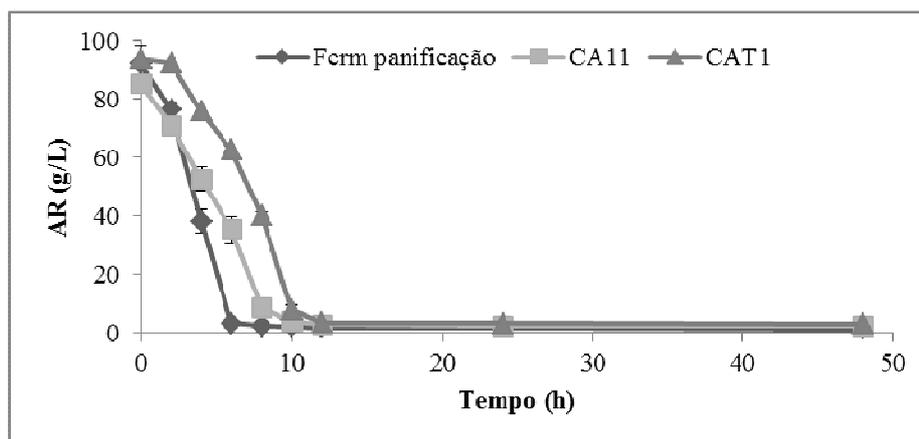


Figura 1 Consumo de açúcares redutores durante a fermentação do hidrolisado de batata por linhagens de *S. cerevisiae* (T1)

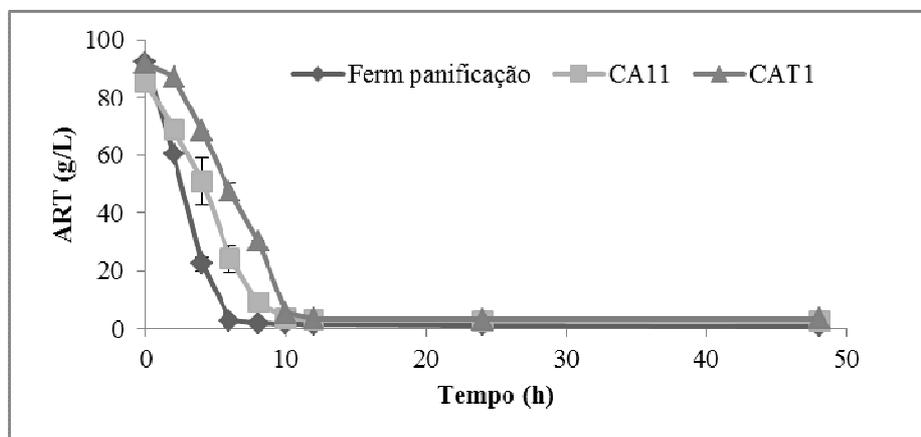


Figura 2 Consumo de açúcares redutores totais durante a fermentação do hidrolisado de batata por linhagens de *S. cerevisiae* (T1)

Como se pode notar, no tratamento 1 para as três isolados de leveduras, a quantidade de açúcares redutores (Figura 1) e redutores totais (Figura 2) diminuíram ao longo da fermentação. Para o fermento panificação, a fermentação teve início com  $92 \pm 7 \text{ g.L}^{-1}$  e  $92,0 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  para AR e ART, respectivamente, passando para  $1,3 \pm 0,1 \text{ g AR.L}^{-1}$  e  $1,83 \pm 0,05 \text{ g ART.L}^{-1}$  ao final de 8 horas de fermentação. Para a levedura selecionada de alambique CA11, as concentrações de açúcares redutores e redutores totais, ao início da fermentação, foram de  $85 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$  de AR e  $85,0 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de ART, caindo após 12 h, para  $2,7 \pm 0,1 \text{ g AR.L}^{-1}$  e  $2,9 \pm 0,4 \text{ g ART.L}^{-1}$ . Utilizando a levedura selecionada de usina de álcool CAT1, os teores iniciais foram de  $93,0 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de AR e de  $93,0 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$  ART, caindo para  $3,4 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de AR e  $3,4 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$  ART ao final de 12h.

Os gráficos das cinéticas de consumo de açúcares redutores e redutores totais, durante a fermentação em meio hidrolisado adicionado de sacarose com 17 °Brix (T2), podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

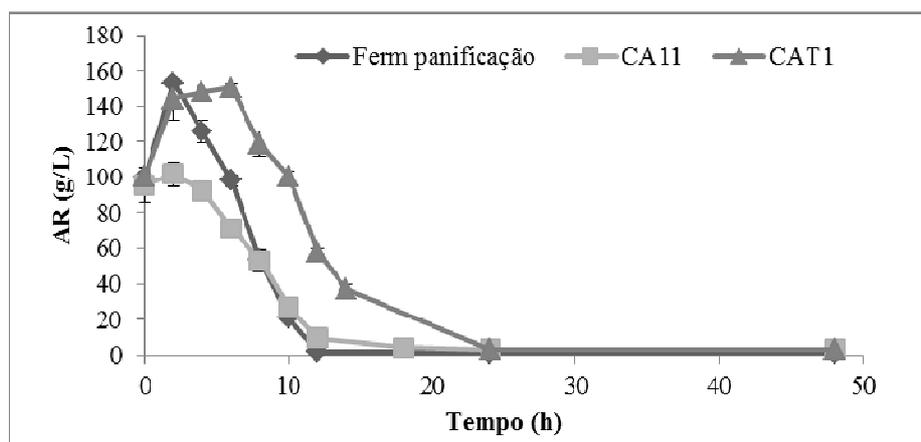


Figura 3 Consumo de açúcares redutores durante a fermentação do hidrolisado de batata acrescido de sacarose batata por linhagens de *S. cerevisiae* (T2)

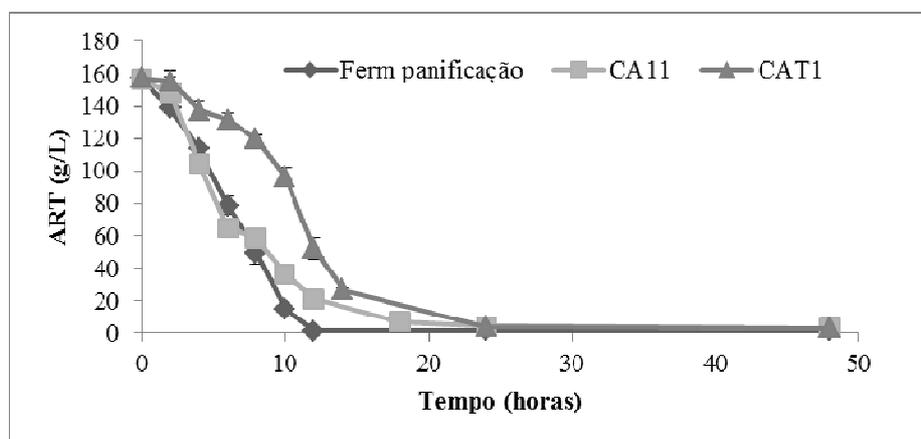


Figura 4 Consumo de açúcares redutores totais durante a fermentação do hidrolisado de batata acrescido de sacarose batata por linhagens de *S. cerevisiae* (T2)

Para o tratamento 2 (T2), utilizando fermento panificação, a fermentação teve início com  $100 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$  g AR.  $\text{L}^{-1}$  e  $157,0 \pm 0,1 \text{ g ART. L}^{-1}$ , obtendo, ao final da fermentação,  $1,2 \pm 0,4 \text{ g AR. L}^{-1}$  e  $1,6 \pm 0,1 \text{ g ART. L}^{-1}$ , em 12 horas. Para levedura selecionada de alambique CA11, a concentração inicial foi de  $95 \pm 10 \text{ g AR. L}^{-1}$  e  $156 \pm 2 \text{ g ART. L}^{-1}$ , encontrando, ao final, concentrações de  $3,1 \pm 0,1 \text{ g AR L}^{-1}$  e  $3,30 \pm 0,02 \text{ g ART L}^{-1}$ , em 18 h de fermentação. A fermentação com a levedura CAT1 foi mais lenta, ocorrendo em 24 horas, inicialmente com concentrações de  $100 \pm 3 \text{ g AR/L}$  e  $157 \pm 4 \text{ g ART/L}$  que caíram ao final para  $3,10 \pm 0,01 \text{ g AR/L}$  e  $3,10 \pm 0,06 \text{ g ART/L}$ .

Nas primeiras 2h para fermento panificação e CA11 e, nas primeiras 6 horas para CAT1, houve um aumento na concentração de açúcares redutores pela quebra da sacarose pela ação das leveduras. Após esse período, pode-se observar que ocorreu a redução das concentrações dos açúcares redutores (Figura 3), em virtude da ação das leveduras, convertendo os açúcares redutores em etanol, um dos principais produtos da fermentação alcoólica (SILVA et al., 2003).

Os resultados demonstraram que as três isolados de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram eficientes em metabolizar os carboidratos, presentes no meio de cultivo, durante a fermentação, tanto para os tratamentos 1 (batata hidrolisada) quanto para o tratamento 2 (batata hidrolisada e sacarose), sendo os açúcares consumidos e obtendo-se baixa concentração destes carboidratos no meio ao final do processo de fermentação para fermento de panificação, CA11 e CAT1.

O fermento de panificação foi o mais rápido em consumir os açúcares nos tratamentos 1 e 2, estabilizando após 8 e 12 horas, respectivamente.

Para o tratamento 2, o tempo final da fermentação foi maior do que para o tratamento 1, pois a sacarose foi hidrolisada, produzindo glicose e frutose que, por sua vez, foram consumidos juntamente com a glicose já presente no meio hidrolisado de batata.

Pataro et al. (2002) recomendam que, para uma fermentação ideal na produção de cachaça, o caldo de cana deve apresentar concentração de açúcar em torno de 14 a 16 °Brix. Teores de açúcar acima de 16 °Brix podem acarretar fermentações mais lentas e, frequentemente, incompletas. Teores elevados de açúcar, no início da fermentação, provocarão estresse das células pela maior quantidade de etanol ao final da fermentação (SCHWAN et al., 2001).

Menezes et al. (2013) estudaram a produção de bioetanol, utilizando cana-de-açúcar diluída com extrato de polpa de café com ajuste para 18 °Brix e levedura selecionada CAT1, observaram que a fermentação terminava com 12 horas.

Schwan et al. (2001) demonstraram que, na fermentação de caldo de cana, de 18 °Brix a 20 °Brix, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* não selecionada, a fermentação, praticamente, estabilizava após um período de 12 horas.

### 3.1.2 Concentração de glicose

Nas Figuras 5 e 6, são apresentadas as curvas do consumo de glicose durante a fermentação para os tratamentos 1 e 2, respectivamente. Na Figura 5, para tratamento 1, pode-se perceber que as concentrações iniciais de glicose nos meios inoculados com fermento panificação, CA11 e CAT1 foram 80; 91,6 e 97,6 g. L<sup>-1</sup>. Ao final de 12 horas de fermentação, praticamente toda a glicose havia sido consumida. A levedura de panificação foi a que levou menor tempo para consumo de glicose e estabilizou em 8 e 12 horas, respectivamente, para tratamento 1 e 2.

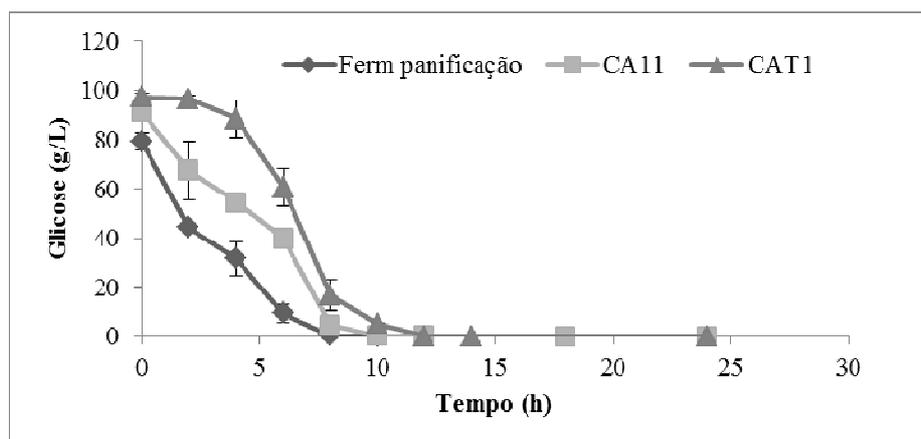


Figura 5 Gráfico da concentração de glicose durante a fermentação do hidrolisado de batata por linhagens de *S. cerevisiae* (T1)

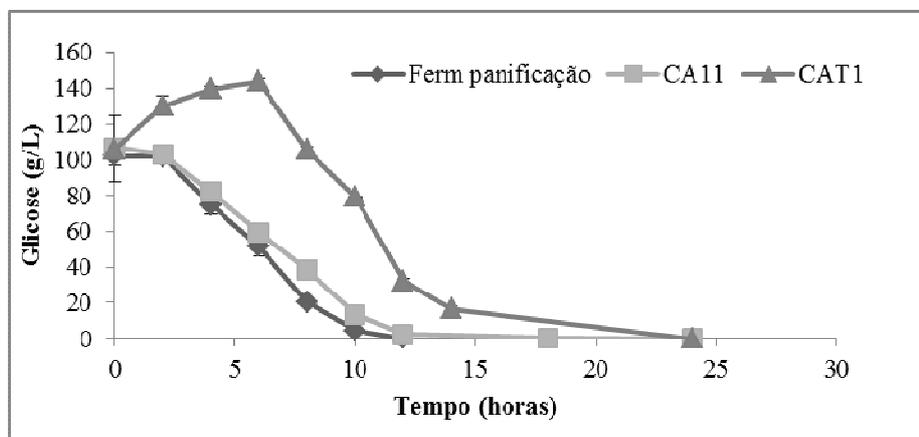


Figura 6 Gráfico da concentração de glicose durante a fermentação do hidrolisado de batata acrescido de sacarose por linhagens de *S. cerevisiae* (T2)

Pela Figura 6, pode-se observar que, no tratamento 2, as concentrações iniciais de glicose foram 102,1; 106,5 e 105,9 g. L<sup>-1</sup> para o fermento panificação, CA11 e CAT1, respectivamente. As fermentações com fermento panificação e com o isolado de *Saccharomyces cerevisiae* CA11 foram muito semelhantes, com duração de 12 h, enquanto que a fermentação com CAT1 foi mais lenta, durando 24h, com aumento na concentração de glicose nas primeiras 6 h. Pode-se observar que o consumo foi mais lento nos ensaios do Tratamento 2, isso pode ser explicado pelo maior teor de açúcares (17 °Brix) pela adição de sacarose ao meio, que era convertida pela enzima invertase das leveduras em glicose.

Lin et al. (2012) estudaram como diferentes concentrações de glicose podem afetar o processo fermentativo e a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. Observaram que concentrações baixas, próximas de 20 g. L<sup>-1</sup> produzem pequenas quantidades de etanol e

que concentrações acima de  $160 \text{ g. L}^{-1}$  de glicose, também, podem reduzir o rendimento na conversão de etanol, uma vez que em maiores concentrações de açúcares as leveduras podem ser inibidas.

### 3.1.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

As evoluções do pH, durante a fermentação do tratamento 1 (hidrolisado) e tratamento 2 (hidrolisado + sacarose), podem ser acompanhadas pelas Figuras 7 e 8, respectivamente. Como se pode notar, os valores iniciais de pH do meio contendo hidrolisado e do meio contendo hidrolisado e sacarose não foram diferentes, situando-se entre 4,0 e 5,0. Portanto, não foi necessário o ajuste de pH para ambos tratamentos, já que, segundo Maia (2006), o pH do mosto deve ser ajustado para valores entre 4,0 e 5,0, pois abaixo desta faixa pode haver aumento da produção de óleo fúsel em até 80%, o que, em excesso, é indesejável nas bebidas. Além de que baixo pH, também, aumenta o efeito tóxico do etanol e ácidos orgânicos em leveduras, influenciando, assim, os parâmetros cinéticos como rendimento alcoólico (DORTA et al., 2006).

Pode-se notar queda rápida do pH nas primeiras 8 horas do processo fermentativo para o tratamento 1 e após 12 horas para o tratamento 2. Após estes períodos, o valor do pH manteve-se, praticamente, constante até o fim.

Durante o processo de fermentação, o pH do meio pode variar por diversas razões, como pela produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico, acético e succínico (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1999).

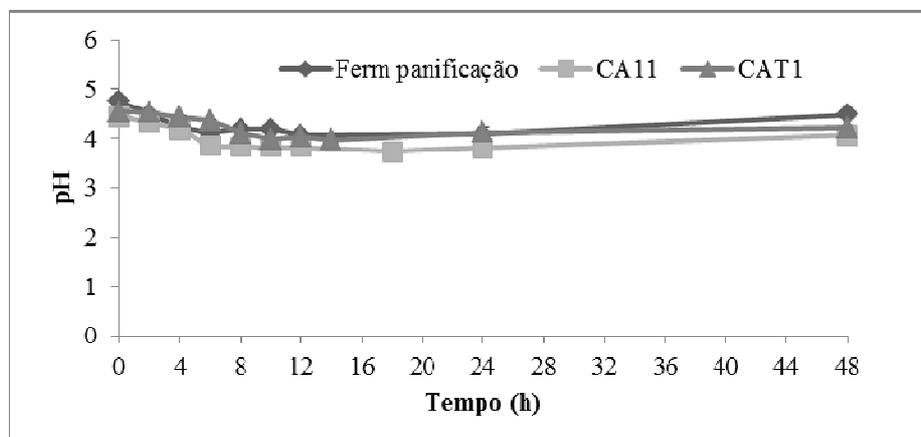


Figura 7 Evolução do pH durante a fermentação de meio contendo hidrolisado de batata por linhagens de *S. cerevisiae* (T1)

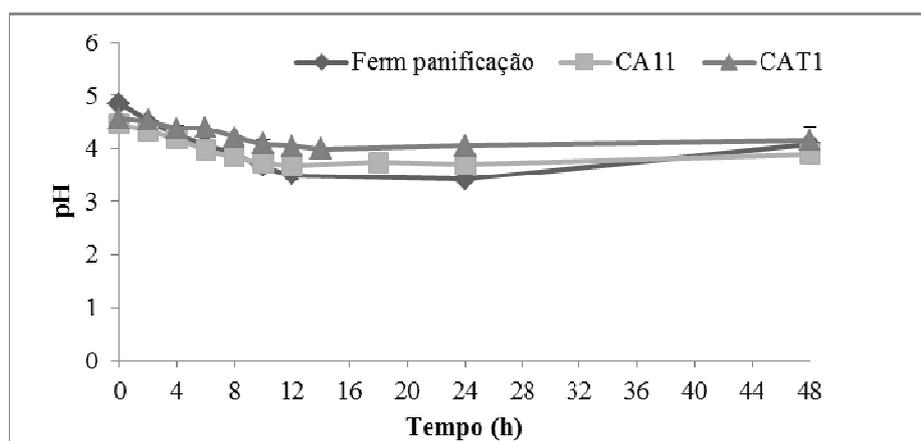


Figura 8 Evolução do pH durante a fermentação de meio contendo hidrolisado de batata + sacarose por linhagens de *S. cerevisiae* (T2)

Arshad et al. (2008), utilizando melão diluído a 29 ° Brix, com valores iniciais de pH variando entre 4,5 e 5,3, a uma temperatura de 30 °C, demonstraram que a produção de etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi maior quando o pH foi de 4,5 (7,42%) do que quando o pH foi de 5,3 (6,31%).

### 3.1.4 Contagem de células

Os dados da contagem de células viáveis em câmara de Neubauer para o tratamento 1, contendo apenas meio hidrolisado, estão apresentados na Tabela 1. Como se pode notar, não houve diferença significativa entre fermento de panificação, CA11 e CAT1 em relação aos tempos, exceto para o tempo de 12 h, onde houve um maior crescimento para fermento de panificação  $4,8 \times 10^8$  células/mL seguido pela CAT1 com  $3,5 \times 10^8$  células/mL e CA11 com  $2,7 \times 10^8$  células/mL. Os três isolados atingiram suas maiores concentrações no período entre 8 e 12h de crescimento. Verificou-se que, entre 12 e 24 h, houve uma pequena diminuição nas concentrações de células para os três isolados, especialmente para o fermento de panificação, que apresentou uma redução estatisticamente significativa, ao nível de 5% de significância, indicando morte celular.

No tratamento 1, as viabilidades celulares para o fermento de panificação, no início e no final do processo, foram de 92% e 85%, respectivamente. Já para a levedura CA11, os valores foram de 87% e 84% de células viáveis, no início e no final do processo fermentativo, enquanto que para levedura CAT1 ao início e final do processo os valores foram de 70% e 81%, respectivamente. Os resultados demonstraram que o meio contendo apenas hidrolisado continha os nutrientes necessários para um bom crescimento das leveduras. Além disso, as viabilidades médias do fermento de panificação e da CA11 foram superiores a 80%, enquanto que a do CAT1 foi em torno de 76%. De acordo com Gouvea et al. (2009), a viabilidade das células deve estar na faixa de 80 a 90% ao

final da fermentação, e os valores obtidos neste trabalho indicaram boas condições de fermentação para os três isolados, ainda que no caso da CAT1 o valor inicial foi um pouco menor do que o desejável.

Tabela 1 Contagem de células viáveis para o tratamento 1, sendo os valores expressos em  $10^8$  células/mL

Tempo	Fermento panificação	CA11	CAT1
0	$1,1 \pm 0,3^{d1}$	$1,3 \pm 0,1^{b1}$	$1,7 \pm 0,3^{d1}$
2	$1,8 \pm 0,7^{cd1}$	$2,2 \pm 0,4^{ab1}$	$1,6 \pm 0,4^{d1}$
4	$2,3 \pm 0,2^{bcd1}$	$2,2 \pm 0,5^{ab1}$	$2,0 \pm 0,2^{cd1}$
8	$3,5 \pm 0,3^{ab1}$	$2,5 \pm 0,7^{ab1}$	$3,7 \pm 0,5^{a1}$
10	$3,3 \pm 0,3^{ab1}$	$2,8 \pm 0,6^{ab1}$	$3,2 \pm 0,6^{ab1}$
12	$4,8 \pm 0,8^{a1}$	$2,7 \pm 0,4^{a3}$	$3,5 \pm 0,2^{ab2}$
24	$2,8 \pm 0,6^{bc1}$	$2,1 \pm 0,3^{ab1}$	$2,7 \pm 0,5^{bc1}$

Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentam diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

Médias seguidas de números iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

As contagens de células viáveis em câmara de Neubauer para o tratamento 2, contendo meio hidrolisado mais sacarose, estão apresentados na Tabela 2. Como se pode notar, os valores máximos de células foram obtidos no período entre 8 e 12 h, assim como no tratamento 1, sendo  $3,5 \times 10^8$  células/mL;  $2,6 \times 10^8$  células/mL e  $3,2 \times 10^8$  células/mL, para fermento de panificação, CA11 e CAT1, respectivamente.

Comparando em um mesmo tempo as contagens das três leveduras, pode-se notar que elas iniciaram com valores, estatisticamente, similares de células viáveis, o que é importante para o estudo do processo

fermentativo, e ao final de 24 horas, elas, também, atingiram valores estatisticamente iguais de células viáveis, demonstrando crescimento celular similar para os três isolados.

A viabilidade para o fermento panificação, inicialmente, foi de 95% chegando ao final do processo com 83%, para a cepa CA11, os valores inicial e final foram de 91% e 82%, respectivamente, enquanto que a cepa CAT1 teve seus valores de viabilidade inicial de 62% e ao final de 85%. Os valores de viabilidade foram altos, com exceção da viabilidade inicial da CAT1, que entretanto, apresentou aumento ao final do processo.

Tabela 2 Contagem de células viáveis para o tratamento 2, sendo os valores expressos em  $10^8$  células/mL

Tempo	Fermento panificação	CA11	CAT1
0	$1,3 \pm 0,07^{c1}$	$1,6 \pm 0,1^{b1}$	$1,3 \pm 0,5^{c1}$
2	$1,8 \pm 0,6^{bc1}$	$2,1 \pm 0,4^{ab1}$	$1,4 \pm 0,3^{c1}$
4	$2,4 \pm 0,3^{ab1}$	$2,3 \pm 0,3^{ab12}$	$1,6 \pm 0,4^{bc2}$
8	$3,5 \pm 0,5^{a1}$	$2,5 \pm 0,2^{a2}$	$1,7 \pm 0,2^{bc3}$
10	$3,3 \pm 0,3^{a1}$	$2,6 \pm 0,4^{a1}$	$2,6 \pm 0,5^{ab1}$
12	$2,7 \pm 0,2^{ab12}$	$2,5 \pm 0,0^{ab2}$	$3,2 \pm 0,5^{a1}$
24	$2,5 \pm 0,4^{ab1}$	$2,3 \pm 0,5^{ab1}$	$2,2 \pm 0,2^{abc1}$

Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentam diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

Médias seguidas de números iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

Pavlak, Lima e Carreiro (2011), ao estudar fermentação de batata doce, com diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*,

encontraram um valor médio de viabilidade de 98,7%, valor este superior aos valores encontrados neste trabalho.

Menezes et al. (2013) estudaram fermentação em caldo de cana diluído com água destilada e caldo de cana acrescido de melaço, ambos com 18° Brix, encontraram viabilidade média de 91 % no início da fermentação e 84 % no final da fermentação, valores próximos ao encontrado neste trabalho.

O etanol é conhecido como um inibidor do crescimento, a taxa de produção de etanol e seu acúmulo dentro das células das leveduras levam a uma queda da viabilidade, explicando, assim, a viabilidade ser menor ao final do processo de fermentação para o fermento de panificação e para CA11.

### **3.1.5 Teor alcoólico**

Os resultados de teor alcoólico, para os tratamentos 1 e 2, estão apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Pode-se notar que houve diferença na cinética de produção de etanol entre os tratamentos 1 e 2 e o tratamento 2 produziu, praticamente, o dobro de etanol que o tratamento 1.

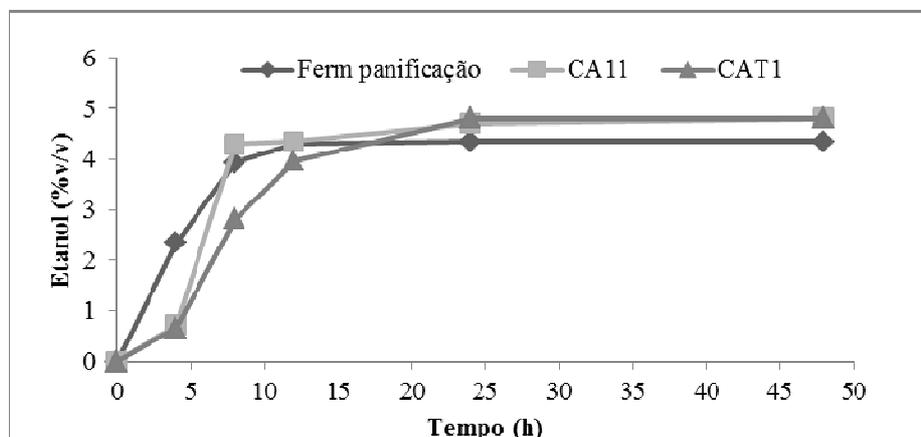


Figura 9 Produção de etanol considerando o meio hidrolisado de batata por linhagens de *S. cerevisiae* (T1)

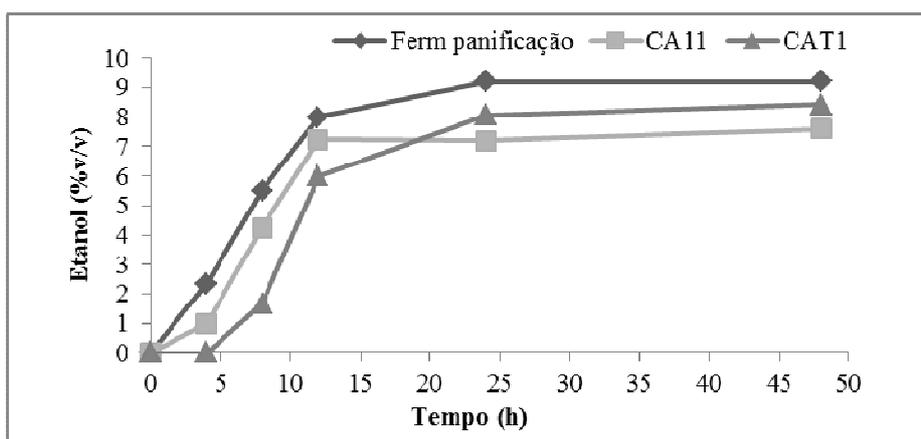


Figura 10 Produção de etanol considerando o meio hidrolisado de batata + sacarose por linhagens de *S. cerevisiae* (T2)

Entre as leveduras estudadas, pode-se perceber que, no tratamento 1, as leveduras selecionadas CA11 e CAT1 produziram, ao final de 48 horas, a mesma quantidade de etanol de 4,8 %v/v, maior que a quantidade produzida pelo fermento panificação que foi de 4,35% v/v. Já para o tratamento 2, o biológico ao final da fermentação produziu mais etanol

(9,2% v/v) que as leveduras selecionadas CA11 (7,6% v/v) e CAT1 (8,41% v/v). Essa diferença na cinética de produção de etanol entre os tratamentos e as leveduras pode ser em virtude do fator inibição por alta concentração de açúcares ao adicionar sacarose ao meio. O teor mais alto de ART no início da fermentação pode provocar uma inibição pelo substrato e acarretar uma demora no consumo destes açúcares (MARQUES; SERRA, 2004).

Tasíc et al. (2009), utilizando ácido clorídrico para hidrolisar amido de batata, obtiveram 100 g. L<sup>-1</sup> de açúcares redutores e uma concentração de etanol de 4,2 % v/v, ao final da fermentação, utilizando fermento de panificação, resultado este semelhante ao deste trabalho (4,35% v/v) com o mesmo tipo de microrganismo.

Laluce et al. (2009), utilizando meio sintético com sacarose como fonte de açúcar e outros suplementos, contendo inicialmente 180 g. L<sup>-1</sup> de açúcares redutores totais no mosto e estirpe híbrida 63M, obtiveram teor final de etanol de 68,7 g. L<sup>-1</sup>, valor este inferior aos encontrados neste trabalho.

Carvalho et al. (2008) observaram um teor alcoólico final de 6% (v/v) utilizando meio de fermentação a 15 °Brix e um fermento de padaria (*S. cerevisiae*). Caldos de cana fermentados para a produção de aguardente têm geralmente de 5 a 9 (% v/v) de etanol (LIMA, 2001).

### 3.1.6 Conversão do substrato em etanol (Yp/s), eficiência fermentativa (E<sub>f</sub>) e produtividade em etanol

Os valores médios e os desvios padrões dos fatores de conversão em relação à produção de etanol (Yp/s), à eficiência fermentativa (E<sub>f</sub>) e à produtividade em etanol (Qp) encontram-se na Tabela 3 e 4, respectivamente, para os tratamentos 1 e 2.

Tabela 3 Fator de conversão Yp/s, eficiência fermentativa e produtividade em etanol para tratamento 1

Microrganismo	Yp/s (g etanol/gAR)	Eficiência fermentativa (%)	Produtividade (g/L.h)
Fermento panificação	0,37 ± 0,03 <sup>b</sup>	73,26 ± 5,27 <sup>c</sup>	4,23 ± 0,02 <sup>a</sup>
CA11	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	89,35 ± 1,54 <sup>a</sup>	3,16 ± 0,01 <sup>b</sup>
CAT1	0,41 ± 0,01 <sup>b</sup>	79,83 ± 2,31 <sup>b</sup>	3,07 ± 0,1 <sup>b</sup>

Tabela 4 Fator de conversão Yp/s, eficiência fermentativa e produtividade em etanol para tratamento 2

Microrganismo	Yp/s (g etanol/gART)	Eficiência fermentativa (%)	Produtividade (g/L.h)
Fermento panificação	0,47 ± 0,01 <sup>a</sup>	89,39 ± 1,08 <sup>a</sup>	5,92 ± 0,1 <sup>a</sup>
CA11	0,37 ± 0,01 <sup>c</sup>	72,53 ± 1,29 <sup>c</sup>	3,35 ± 0,01 <sup>c</sup>
CAT1	0,43 ± 0,01 <sup>b</sup>	84,41 ± 0,13 <sup>b</sup>	2,76 ± 0,04 <sup>b</sup>

Considerando-se que o máximo fator de conversão de glicose em etanol (máximo Yp/s) igual a 0,511 (LIMA, 2001), pode-se concluir que os fatores de conversão obtidos foram bons, sendo o maior valor de 0,47g etanol/g ART, obtido para fermento de panificação no tratamento 2.

Para o tratamento 1, os maiores valores para o fator de conversão de substrato em etanol foram obtidos pelas isolados CA11 e o menor para

CAT1 e fermento de panificação, que não se diferenciaram a 5% de significância. Porém, ao se adicionar sacarose ao meio, o maior fator de conversão foi obtido usando-se fermento de panificação, seguido dos isolados CAT1 e CA11. Essa diferença para CA11 entre os tratamentos poderia ser explicada por uma menor resistência a altas concentrações de etanol no meio.

Duarte, Amorim e Schwan (2012) obtiveram uma taxa de conversão de substrato em produto *S. cerevisiae*, isolado CA11, de 0,47 g/g para fermentação em cana-de-açúcar, valores este semelhantes ao encontrado para o tratamento 1 e menor que o tratamento 2.

Marini et al. (2009), por sua vez, fermentaram caldo de cana-de-açúcar, utilizando isolados selecionadas para a produção de cachaça e encontraram valores para  $Y_p/s$  variando de 0,26 até 0,40 g etanol/ g ART, também, próximos aos encontrados neste trabalho para levedura selecionada para produção de cachaça (CA11) que variou entre 0,37 e 0,46 g etanol/ g ART.

Andrietta, Migliari e Andrietta (1999) estudaram leveduras isoladas de usina de álcool e encontraram valores de  $Y_p/s$  variando entre 0,44 e 0,47 g etanol/ g ART, corroborando com os valores obtidos neste trabalho que foi 0,41 (T1) e 0,43g etanol/ g ART (T2) para levedura selecionada de usina de álcool CAT1.

Oliveira et al. (2004) propuseram uma classificação para seleção de estirpes de leveduras para cachaça, de acordo com o rendimento de etanol pelo consumo de substrato, em que estirpes com  $Y_p/s$  entre 0,38 a 0,41 foram agrupadas em nível baixo de conversão, aquelas que variaram entre 0,42 e 0,45 g/g foram agrupadas no nível médio de rendimento e as estirpes com valores entre 0,45 e 0,49 g/g foram agrupadas no nível alto,

enquanto aquelas com valores de conversão entre 0,491 a 0,51 classificadas em nível alto de conversão. Assim, nas condições de cultivo observadas neste estudo e de acordo com a classificação posposta por Oliveira et al. (2004), o fermento de panificação se encontra no nível alto, o isolado CA11 em nível baixo, enquanto que o isolado CAT1 está no nível médio de rendimento.

Para a eficiência fermentativa, foram encontrados valores de 73 a 89%. No tratamento 1, o isolado de maior eficiência foi CA11 com 89% e no tratamento 2, o melhor isolado foi o fermento de panificação, também, com 89%.

Pavlak, Lima e Carreiro (2011) encontraram valor de eficiência fermentativa média de 91,1% para fermento de panificação em processo fermentativo batelada de meio hidrolisado de batata doce, valor este próximo ao encontrado neste trabalho.

Menezes et al. (2013) utilizaram levedura selecionada CAT1 para fermentar extrato de polpa de café, obtiveram valores da eficiência fermentativa variando de 81,60% até 87,25%, valores semelhantes aos deste trabalho para mesma cepa utilizada.

Duarte, Amorim e Schwan (2012) encontraram valores de eficiência da fermentação de 92,19%, para a levedura selecionada CA11, em caldo de cana-de-açúcar.

Para a produtividade em etanol, foram encontrados valores de 4,23 e 5,92 g/L.h, para fermento de panificação, 3,16 e 3,35 g/L.h para CA11 e 3,07 e 2,76 para CAT1, respectivamente, para os tratamentos T1 e T2. Como pode ser observado, a produtividade em etanol foi maior com fermento de panificação, que apresenta menor tempo de fermentação.

Marini et al. (2009) encontraram valores de 3,3 a 6,2 g/L.h, estando de acordo os resultados para os tratamentos 1 e 2 encontrados neste trabalho.

Duarte, Amorim e Schwan (2012) encontraram produtividade de 1,56g/L h utilizando cepa CA11, valores estes menores que o encontrado (3,16 e 3,35 g/L.h).

Mediante os resultados pode-se notar que, ao adicionar sacarose ao meio de fermentação, ocorreu aumento significativo para produtividade em etanol utilizando fermento de panificação. No entanto, para as leveduras selecionadas, o aumento não foi expressivo, possivelmente, em decorrência de algum fator de inibição. Os tempos de fermentação, para fermento de panificação, isolados CA11 e CAT foram de 12, 18 e 24 horas, respectivamente.

### **3.1.7 Destilação e teor de compostos secundários**

Ao final da primeira destilação, obteve-se teor alcoólico igual a 54° GL, na segunda destilação, um teor alcoólico de 82° GL, que foi, então, diluído em água potável para atingir teor alcoólico desejado. Os resultados obtidos, para a análise físico-química da vodca, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Análises físico-químicas da vodca filtrada em carvão ativado

Itens analisados	Amostra	Legislação
Exame organoléptico	Normal	
Densidade relativa (20/20°C)	0,95015	
Cobre (mg/L)	ND	≤ 5
Extrato seco a 100°C (g/L)	0,092	
Grau alcoólico real a 20°C (%v/v)	39,71	36-54
Acidez volátil em ácido acético*	15,29	
Álcoois superiores*	122,52	
Álcool n-propílico*	50,97	
Álcool isobutílico*	37,5	
Álcool isoamílico*	34,05	
Álcool sec-butílico*	ND	
Álcool n-butílico*	ND	
Furfural*	ND	
Aldeídos em aldeído acético*	6,02	
Ésteres em acetado de etila*	4,5	
Soma dos componentes secundários*	148,33	≤ 50
Álcool metílico*	35,04	≤ 20

ND- Não detectado \* mg/100 mL álcool anidro

Com base no exame organoléptico, pode-se afirmar que os parâmetros analisados, como aspecto, coloração e limpidez foram normais.

A ausência de cobre na amostra pode ser justificada pela limpeza realizada no alambique antes da destilação, ou pela remoção deste pela utilização de carvão ativado. Segundo Cardoso (2013), a higiene do alambique no momento da destilação é imprescindível para evitar contaminações com o metal.

Lima et al. (2006) estudaram a remoção de cobre por carvão ativado em cachaça e perceberam que, na presença de 26 g/L de carvão

ativado com tempo de agitação de 10 minutos já ocorria redução significativa de cobre.

O grau alcoólico neste estudo está de acordo com a legislação brasileira para vodcas (BRASIL, 2008), que estipula uma concentração de 36 a 54% v/v.

A soma da concentração de álcoois superiores foi de 122,52 mg/100mL álcool anidro. Estudos encontrados sobre vodcas produzidas em outros países relatam ausência (abaixo do limite de detecção do método) ou presença em baixas concentrações de álcoois superiores (LACHENMEIER et al., 2010a, 2010b).

A produção de álcoois superiores pode ser uma característica das leveduras em geral, e as quantidades produzidas variam com as condições de fermentação e, também, com o gênero, espécie e, provavelmente, com a cepa utilizada (GIUDICI; ROMANO; ZAMBONELLE, 1990).

Pode-se observar, também, que não foi detectado furfural na amostra, isso se deve ao fato do fermentado ter sido centrifugado para retirada de substâncias orgânicas como açúcares residuais e compostos sulfatados, sendo destilado o vinho limpo.

A concentração de aldeídos encontrada foi de 6,02 mg/100mL de álcool anidro. Segundo Nykänem (1986), vodcas possuem baixos níveis de aldeídos, frequentemente menores que 10 mg/L.

Foi encontrado ésteres em acetato de etila em uma concentração de 4,5 mg/100mL de álcool anidro. Lachenmeier et al. (2009) analisaram 30 amostras de vodca comercializadas na Polônia e detectaram acetato de etila em apenas duas amostras. As concentrações encontradas foram de

0,5 e 1,3 mg/100 mL de álcool anidro, valores estes menores que o encontrado neste trabalho.

Com relação à ocorrência de metanol em vodcas, o limite máximo previsto na legislação brasileira para vodcas é de 20 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL, 2008). Lachenmeier et al. (2010b), analisando 13 marcas de vodcas da Ucrânia, detectaram um teor médio de metanol de 4 mg/100 mL de álcool anidro.

A soma dos compostos secundários foi de 148,33 mg/100mL de álcool anidro, superior à permitida pela legislação brasileira, que determina a soma dos compostos secundários sendo de 50 mg/100mL de álcool anidro (BRASIL, 2008).

De acordo com Alcarde (2010), os efeitos na redução da concentração dos congêneres da bebida dependem do tipo de carvão ativado utilizado. Normalmente os produtores de vodca utilizam várias colunas de depuração do álcool potável, preenchidas com diferentes tipos de carvão ativado.

#### **4 CONCLUSÃO**

A adição de sacarose ao meio hidrolisado derivado da batata é necessária para aumentar o teor de açúcares no mosto, promovendo uma maior produção de etanol em relação ao meio contendo apenas o hidrolisado. Entre as leveduras, o fermento de panificação demonstrou maior eficiência (89 %), maior rendimento em etanol ( $Y_{p/s} = 0,47$  g etanol/g ART) e maior produtividade em etanol (6,05 g/Lh) que as leveduras selecionadas CA11 e CAT1.

No processo de destilação, obteve-se alto teor alcoólico, chegando ao final da segunda destilação com 82° GL, que após diluição adequada passou pelo processo de filtração em carvão ativado, as análises físico-químicas da vodca demonstraram uma soma de compostos congêneres maior que a permitida pela legislação brasileira para vodca que é de 50 mg/100mL de álcool anidro.

Contudo, são necessários maiores estudos sobre o processo de destilação e filtração com carvão para que se possa obter uma vodca de melhor qualidade.

#### **AGRADECIMENTOS**

À CAPES pelo financiamento; à LNF Latino Americano por gentilmente ceder as leveduras selecionadas CA11 e CAT1, presentes neste trabalho. Ao Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente (LAFQA) do Departamento de química da UFLA, em especial à

professora Maria das Graças Cardoso e à analista Cleusa de Fátima e Silva.

**PRODUCTION OF VODKA FROM POTATO (*Solanum tuberosum* L.), AGATA CULTIVAR, USING DIFFERENT *Saccharomyces cerevisiae* ISOLATES**

**ABSTRACT**

This study aimed at evaluating the use of potato agata cultivar as substrate for the production of vodka. The behaviors of three *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolates, baking yeast, CA11 and CAT1 were evaluated. For each isolate, we tested two concentrations of soluble solids in the fermentation medium, one containing only potato hydrolyzate (11° Brix) and the other containing potato hydrolyzate supplemented with sucrose (17° Brix). The three yeast isolates were evaluated regarding fermentation yield and ethanol production. The best results were obtained using baking yeast, with higher substrate to product conversion (0.47 g ethanol / gART), higher yield (91.4%) and higher alcohol content (6.05% v/v), using a medium with 17 ° Brix. From this yeast and medium conditions, we performed a new fermentation, with the fermentation medium clarified in a centrifuge and, subsequently, two successive distillations were performed, one on copper still and another in a glass column with silicone filling. The distillate was filtered with activated carbon, and analysis of the secondary compounds were conducted, its values compared with the identity standard and vodka quality established by Brazilian legislation.

Keywords: Vodka. Fermentation. *Saccharomyces cerevisiae*. Secondary compounds. Distillation.

## REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R. Bebidas destiloretificadas: vodka e gin. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas alcoólicas**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 1, p. 413-421.
- ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 7, n. 5, p. 54-59, 1999.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: E. Blücher, 1990. v. 5, 243 p.
- ARSHAD, M. et al. Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, p. 410-414, 2008.
- BRASIL. Decreto nº 2314, de 4 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Regulamenta a Lei nº 8918 de 14 de julho de 1994. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 set. 1997. Seção 1, p. 19549.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 24 de abril de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2008.
- CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2013. 340 p.
- CARVALHO, W. et al. Cinética da fermentação e balanço de massa da produção de cachaça artesanal. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, dez. 2008. Disponível em: <[http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial\\_2009\\_2/v12ne\\_t0001.pdf](http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0001.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*: PE-2 and M-26. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 177-182, Feb. 2006.

DURATE, W. F.; AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeast with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 175-195, Jan. 2013.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância**. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010. Software.

GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLE, C. A biometric study of higher alcohol production in *saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 61-64, 1990.

GOUVEA, B. M. et al. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, n. 9, p. 1315-1319, Sept. 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1, 1000 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008. v. 1, 1000 p.

LACHENMEIER, D. W. et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **Biomed Central**, London, v. 10, p. 266-281, June 2010a.

LACHENMEIER, D. W. et al. The composition of unrecorded alcohol from eastern Ukraine: is there a toxicological concern beyond ethanol

alone? **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 2842-2847, Oct. 2010b.

LACHENMEIER, D. W. et al. The quality of alcohol products in Vietnam and its implications for public health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 6, n. 8, p. 2090-2101, Aug. 2009.

LACHENMEIER, D. W. et al. The use of ion chromatography to detect adulteration of vodka and rum. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 105-110, Dec. 2003.

LACHENMEIER, D. W.; SCHMIDT, B.; BRETSCHEIDER, T. Rapid and mobile brand authentication of vodka using conductivity measurement. **Microchimica Acta**, Dordrecht, v. 160, n. 1/2, p. 283-289, Jan. 2008.

LALUCE, C. et al. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 4, p. 627-637, 2009.

LEE, S.; ROBINSON, F.; WANG, H. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, New York, n. 11, p. 641-649, 1981.

LIMA, A. J. B. et al. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 247-250, 2006.

LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E. et al. (Coord.). **Biociologia industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 3, 616 p.

LIN, Y. et al. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 47, p. 395-401, Dec. 2012.

MAIA, A. B. R. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SEBRAE-MG, 2006. 129 p.

MARINI, M. M. et al. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce tradicional and industrial cachaça: a comparative study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 235-242, Feb. 2009.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 532-535, out./dez. 2004.

MENEZES, E. G. T. et al. Use of diferente extracts of coffe pulp for the production of bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 2, p. 673-687, Jan. 2013.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence off flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, p. 89-96, 1986.

OLIVEIRA, E. S. et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 19-24, 2004.

PATARO, C. et al. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação de cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 217, p. 37-43, 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.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

SILVA, R. N. et al. Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

SIRÍŠŤOVÁ, L. et al. Changes in quality parameters of vodka filtered through activated charcoal. **Czech Journal of Food Science**, Praha, v. 30, n. 5, p. 474-482, 2012.

TASÍČ, M. B. et al. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 43, n. 15, p. 208-211, Feb. 2009.

## APÊNDICES

## APENDICE A - Curva padrão de glicose e sacarose para análise de AR e ART

As Figuras 11 e 12, as curvas padrões de glicose e sacarose, respectivamente, com suas concentrações e absorvâncias, correlacionando à absorvância da amostra com sua concentração, conforme o método de DNS.

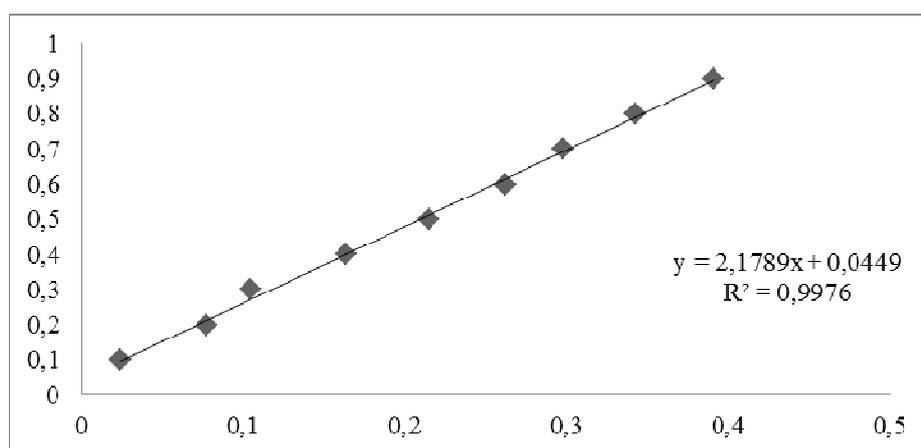


Figura 11 Correlação da absorvância com a concentração de glicose

A concentração de glicose é dada por:

$$\text{Con. glicose (g/L)} = (1,4839 \times \text{Absorvância encontrada}) + 0,0449$$

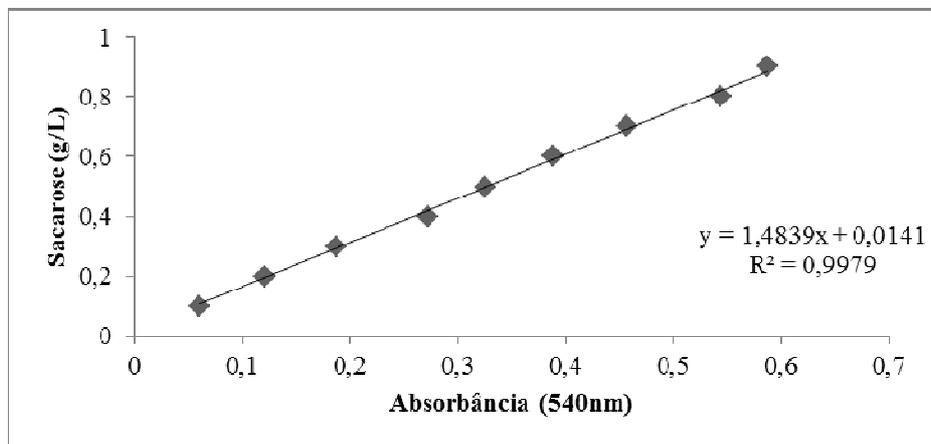


Figura 11 Correlação da absorvância com a concentração de glicose

A concentração de sacarose é dada por:

$$\text{Con. sacarose (g/L)} = (1,4839 \times \text{Absorvância encontrada}) + 0,0141$$