

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

INOVAÇÃO E OTIMIZAÇÃO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
ETANOL A PARTIR DE BATATA-DOCE

TESE DE DOUTORADO

Cristiane Martins Schweinberger

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

INOVAÇÃO E OTIMIZAÇÃO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
ETANOL A PARTIR DE BATATA-DOCE

CRISTIANE MARTINS SCHWEINBERGER

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Engenharia Química

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

Linha de Pesquisa: Engenharia de Sistemas – Projeto, Modelagem, Controle e Otimização de Processos

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler

Co - Orientadora:

Profa. Dra. Luciane Ferreira Trierweiler

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese de doutorado “Inovação e Otimização no Processo de Produção de Etanol a partir de Batata-Doce”, elaborada por Cristiane Martins Schweinberger, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Engenharia Química.

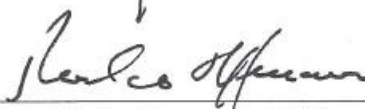
Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Daniele Misturini Rossi – UFRGS



Prof. Dr. Harold Ospina Patino – UFRGS



Prof. Dr. Ronaldo Hoffmann – UFSM

Resumo

No contexto energético o bioetanol tem recebido considerável atenção, por questões ambientais e também pela redução da dependência dos combustíveis de origem fóssil. Embora o Brasil seja o segundo maior produtor mundial de etanol, a produção está concentrada em determinadas regiões, enquanto o Rio Grande do Sul é basicamente um importador. Para mudar tal situação, a batata-doce é uma matéria-prima atrativa, por ser rica em amido e possuir características agronômicas vantajosas. Visando colaborar para a viabilização em maior escala da produção de etanol a partir de batata-doce, o presente trabalho reúne estudos sobre este tema. De trabalhos anteriores desenvolvidos no GIMSCOP, ficou o desafio da obtenção de teores de etanol no vinho entre 10 – 12% (v/v), o que foi alcançado neste trabalho com o aumento da concentração batata: água para 1,5 kg: 1 L. A enzima comercial Stargen 002, recomendada pelo fabricante para o amido granular, foi utilizada para a hidrólise. Em ensaios amido granular vs. batata pré-aquecida em banho-maria (a 76°C), foi obtido um teor de etanol de 9,25% (v/v) em 24 h com o aquecimento prévio, enquanto que com a batata-doce crua o teor foi de 6,13% (v/v) em 58 h. Portanto, o método com a batata pré-aquecida foi selecionado, onde após o pré-aquecimento três processos são conduzidos em única etapa: hidrólise, fermentação e redução da viscosidade. Como resultado de um planejamento composto central, a temperatura e o tempo do processo apresentaram efeitos significativos, com maior sensibilidade à temperatura do que ao tempo. Como a temperatura praticada já estava em torno do ótimo (34°C), o maior ganho foi na redução do tempo, de 24h para 19h. Objetivando aumentar a eficiência de conversão, foi avaliado o efeito do pré-aquecimento em micro-ondas e também do amadurecimento da batata pós-colheita (atuação das próprias amilases ao longo do tempo). O amadurecimento foi positivo, o pico na produção de etanol foi em 25 dias após a colheita. Não foi observado ganho no pré-aquecimento com micro-ondas. Na estimativa de custos do processo, a levedura e a matéria-prima implicaram nas maiores frações do custo total. Visando um futuro processo de destilação com injeção de CO₂, é apresentado um estudo teórico-experimental sobre o equilíbrio da mistura água-etanol-CO₂ incluindo o estudo experimental de injeção de CO₂ em um vinho de batata-doce. Viu-se que são necessários aperfeiçoamentos no modelo e no aparato experimental. Contudo, os resultados experimentais mostraram que se conseguem maiores concentrações de etanol no condensado nas menores vazões de CO₂. Foi identificada uma relação linear entre a umidade da batata-doce e o teor de açúcares redutores totais (ART), resultando em uma proposta de estimativa interessante pela praticidade, mas se aconselha que a curva seja construída com dados de um tipo de batata e de fontes controladas. Também, um bom ajuste de curva requer que o método analítico empregado na produção dos pontos seja confiável. Foi iniciado um estudo comparativo de métodos, que deve ser continuado a fim de maximizar a quantificação de glicose com o menor custo de análise.

Palavras-chave: amido, batata-doce, CO₂, destilação, etanol, fermentação, hidrólise.

Abstract

In the energy context ethanol has received considerable attention due to environmental issues and also by reducing the fossil fuels dependence. Although Brazil is the second largest ethanol producer in the world, the production is concentrated in certain regions, whereas Rio Grande do Sul state is practically an exclusive importer. To change this situation, sweet potato is a very attractive feedstock, because it is rich in starch and has favorable agronomic characteristics. Aiming to contribute to the viability of ethanol production from sweet potato in larger scale, this work brings studies upon this topic. In GIMSCOP's previous works, there was the challenge of obtaining ethanol concentration in wine between 10 – 12% (v/v), which was achieved in this work, by increasing the concentration potato: water to 1.5 kg: 1 L. The commercial enzyme Stargen 002 was used for hydrolysis, the manufacturer indicates it to the granular starch. In experiments: granular starch vs. potato preheated in water bath (at 76°C), was obtained an ethanol content 9.25% (v/v) in 24 h when applying the preheating, whereas with raw sweet potato the ethanol content was 6.13% (v/v) in 58 h. Therefore, the preheating method was selected, where after preheating three processes are conducted in a single stage: hydrolysis, fermentation and reduction of viscosity. A central composite design was carried out, the temperature and process time showed significant effects, with higher sensitivity to temperature than time. However, the practiced temperature was already around the optimum (34°C), the most important gain was the time reducing, from 24 h to 19 h. In order to increase conversion efficiency, was evaluated the effect of pre-heating in microwave and also sweet potato ripening over post-harvest (action of own amylases over time). The ripening was positive, the ethanol production peak was at 25 days after harvest. There was no gain in the preheating with microwave. In the process's costs estimation, the yeast and feedstock resulted in the largest fraction of total cost. Aiming a future process of distillation with CO₂ injection, this work presents a theoretical and experimental study of the mixture water-ethanol-CO₂ equilibrium, also there is an experimental study of CO₂ injection through a sweet potato wine. It was seen that improvement is needed in the model and the experimental apparatus. However, experimental results showed that higher ethanol concentrations can be obtained in the condensate with lower CO₂ flows. A linear relationship was found between the sweet potato moisture and the total reducing sugars (TRS), resulting in an interesting proposal for estimating due to practicality, but it is advisable that the curve be constructed with data from a kind of sweet potato with controlled sources. Also, a good curve fitting requires a reliable analytical method when obtaining the experimental points. A comparative study between methods was initiated, and it must be continued, in order to maximize the glucose quantification with lower cost analysis.

Keywords: starch, sweet potato, CO₂, distillation, ethanol, fermentation, hydrolysis.

Agradecimentos

Começo agradecendo aos meus orientadores, Jorge e Lú, que foram muito presentes nesta jornada. São pessoas que admiro pela inteligência, dedicação, visão e humanidade. Foram orientadores inspiradores, sempre estimulando a ampliação do conhecimento em diferentes áreas. Contribuíram muito na minha formação profissional e humana, sou imensamente grata!

Agradeço aos colegas, que dividiram ideias, que dedicaram uma parte do seu tempo para me ensinar técnicas e que se tornaram amigos. Neste agradecimento não posso deixar de mencionar a Sara, Rúbia, Lucas e Nel.

Agradeço aos técnicos, Eduardo, Carol, Tati, Bruna e Marcos, todos sempre solícitos. Mas, agradeço especialmente ao Eduardo e à Carol, aos quais eu constantemente pedia ajuda, e eles sempre foram gentis e dispostos.

Agradeço aos queridos bolsistas, que foram dedicados, inteligentes, contribuíram muito e aprendi muito com eles. Agradeço em especial à Tai, Tobias, Ricardo e Camila.

Minhas amigas, Dane, Nana e Pri, que viveram este doutorado junto comigo, que também foram minhas terapeutas nos momentos “ah, está difícil”, que comemoravam junto cada etapa concluída. Enfim, simplesmente por terem sido amigas, irmãs, sempre transmitindo energia positiva e motivação para esta conquista. Muito obrigada gurias! Vocês tornaram estes anos mais leves e divertidos.

Mãe, pai, Carla e Bruna, minha família! Que só o fato de existirem na minha vida fez toda diferença. Agradeço ao imensurável amor, que me inspirou e motivou.

Por fim, agradeço a Deus, que nesta vida passageira nos presenteia com caminhos de aprendizado e amadurecimento, e ainda neste percurso nos abençoa com pessoas especiais como as quais tive a oportunidade de dividir esta etapa de minha vida.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1 Motivação	1
1.2 Objetivos.....	7
1.3 Estrutura do trabalho	8
1.4 Contribuições.....	9
1.5 Resumo gráfico	10
1.6 Referências	11
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica: Produção de Etanol a partir de Amiláceas .	13
2.1 O amido	13
2.2 Produção de etanol a partir do amido	16
2.3 Componentes da parede celular e influência no processo	19
2.3.1 Celulose	21
2.3.2 Hemicelulose	21
2.3.3 Substâncias Pécicas.....	21
2.4 Fermentações com elevada densidade	22
2.5 Processos produtivos.....	24
2.5.1 Estudos com batata-doce.....	27
2.6 Referências	30
PARTE I - Caracterização da matéria-prima.....	34
Capítulo 3 – A Simple equation for total reducing sugars estimation on sweet potato and ethanol yield potential.....	35
3.1 Introduction	36
3.2 The Proposal: existence of a relationship between TRS with moisture in sweet potato	37
3.3 Materials and methods.....	38
3.3.1 Proposal verification	38
3.3.2 TRS equation results compared with other experimental data.....	38
3.3.3 Sweet potato mash and ethanol potential equation	39
3.4 Results and discussion	39
3.4.1 Proposal verification	39
3.4.2 TRS equation results compared with other experimental data.....	45
3.4.3 Sweet potato mash and ethanol potential equation	46
3.5 Conclusions.....	49
3.6 References	50
Capítulo 4 – Study of sweet potato starch hydrolysis for total glucose quantification.....	53
4.1 Introduction	54
4.2 Materials and methods.....	55
4.2.1 Amylases.....	55
4.2.2 Sample preparation.....	56
4.2.3 Prehydrolysis	56
4.2.4 Hydrolysis of starch	57
4.2.5 Glucose quantification	58

4.2.6	Moisture determination.....	59
4.2.7	TRS theoretical estimation.....	59
4.2.8	Statistical analysis.....	59
4.3	Results.....	59
4.3.1	Stage 1.....	59
4.3.2	Stage 2.....	61
4.3.3	Stage 3.....	62
4.4	Discussion.....	63
4.5	Conclusion.....	64
4.6	References.....	64
PARTE II - Processo fermentativo		67
Capítulo 5 – Definição das condições e processos operacionais – visão macro		68
5.1	Métodos analíticos.....	68
5.2	Enzimas utilizadas e condições gerais dos experimentos.....	69
5.3	Estudo 1: Efeito da temperatura de liquefação na hidrólise.....	70
5.4	Estudo 2: Emprego de micro-ondas no processo (pré-aquecimento).....	72
5.5	Estudo 3: Liquefação realizada em micro-ondas.....	74
5.6	Estudo 4: Método de pré-aquecimento da batata-doce.....	76
5.7	Considerações finais.....	79
5.8	Referências.....	80
Capítulo 6 – Improving the ethanol production from sweet potato		82
6.1	Introduction.....	83
6.2	Materials and methods.....	84
6.3	Results.....	87
6.4	Conclusion.....	94
6.5	References.....	95
Capítulo 7 – Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods and cost analysis.....		98
7.1	Introduction.....	99
7.2	Materials and methods.....	100
7.3	Results.....	104
7.3.1	Experimental results.....	104
7.3.2	Simulation and costs analysis.....	107
7.4	Conclusions.....	112
7.5	References.....	113
7.6	Apêndice – Atualização da análise de custos.....	116
PARTE III - Pós-processamento: separação do etanol		119
Capítulo 8 – Utilização do CO₂ em misturas de etanol e análise do equilíbrio de fases		
8.1	Introdução.....	121
8.2	Materiais e métodos.....	123
8.2.1	Modelo termodinâmico de equilíbrio da mistura.....	123
8.2.2	Estudo experimental.....	125

8.3	Resultados	127
8.3.1	Implementação do modelo	127
8.3.2	Resultados experimentais	128
8.4	Conclusões	136
8.5	Referências	137

PARTE IV - O modelo de biorrefinarias de batata-doce e projeção de cenários .140

Capítulo 9 – Batata-doce: uma opção para a produção de etanol no RS.....141

9.1	Modelo Descentralizado de Produção	142
9.2	Resultados obtidos no GIMSCOP.....	142
9.3	Batatas de elevada produtividade.....	143
9.4	Biorrefinaria: produção integrada para a viabilidade econômica.....	144
9.5	Referências	145

Capítulo 10 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros147

10.1	Balanço dos objetivos propostos.....	147
10.2	Conclusões gerais	149
10.3	Sugestões para trabalhos futuros.....	151
10.3.1	Aperfeiçoamento do modelo para a estimativa dos ART	151
10.3.2	Estudo da destilação com injeção de CO ₂	151
10.3.3	Aprofundamento do estudo sobre o método de aquecimento.....	152
10.3.4	Estudos para a redução do custo com a levedura	152
10.3.5	Redução do teor de sólidos.....	152
10.3.6	Aumento da concentração de substrato no meio	152
10.3.7	Estudos sobre a produção de coprodutos	152
10.3.8	Estudos para a redução ou remoção do antibiótico	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Demanda de etanol no Brasil entre 2014 – 2015 e projeção até 2024.	2
Figura 1.2: Distribuição da produção de etanol no Brasil por Estado.	3
Figura 1.3: Produtividade agrícola da cana-de-açúcar no RS, dados de 2014 da produtividade de 393 municípios gaúchos.	5
Figura 1.4: Histograma sobre a produtividade da batata-doce no RS, o gráfico foi construído com dados de 2014 da produtividade de 456 municípios gaúchos.	6
Figura 1.5: Resumo gráfico: conexões entre os objetivos, capítulos e contribuições.	10
Figura 2.1: Estrutura molecular do amido.	13
FONTE: Adaptado de Royal Society of Chemistry (2014).	13
Figura 2.2: Imagem do grânulo de amido de batata-doce. Escala de 0,1 mm.	14
Figura 2.3: (A) Classificação das cadeias de amilopectina em tipo A, B e C. (B) Estrutura da amilopectina formando regiões amorfas e cristalinas. (C) Modelo de estrutura interna do grânulo, com a visualização dos anéis de crescimento e do hilum.	15
Figura 2.4: Grânulos de amido nativos exibindo a cruz de malta (birrefringência) sob a luz polarizada.	15
Figura 2.5: Imagens do amido de milho em processo de gelatinização. As temperaturas nas imagens foram (A) 40°C (60 min.), (B) 60°C (20 min.) e (C) 70°C (5 min.). A temperatura de gelatinização era 71°C.	16
Figura 2.6: Reações e estequiometria do processo de hidrólise do amido e fermentação.	17
Figura 2.7: Estrutura da parede celular de vegetais.	20
Figura 2.8: Imagens de uma seção transversal de batata. (A) Antes e (B) depois de um pré-tratamento enzimático com celulases, hemicelulases e pectinases.	20
Figura 2.9: Integração entre a melhoria da levedura e aplicação nos processos de produção de etanol.	23
Figura 2.10: Processos de produção de etanol a partir do milho.	25
Figura 2.11: Produção de etanol com elevada densidade (processo de moagem seca). São consideradas algumas práticas/entradas adicionais em itálico, as quais possuem importância por aumentar a eficiência do processo.	26
Figura 2.12: Resultado do estudo de pré-tratamento para a redução de viscosidade, testes com diferentes enzimas comerciais.	28
Figure 3.1: Stoichiometry of hydrolysis reactions of starch and sucrose.	38
Figure 3.2: Images of sweet potato cultivars developed by Embrapa.	39
Figure 3.3: Linear correlation between moisture and Total Reducing Sugars (TRS). Data plotted from Table 3.1.	40
Figure 3.4: Linear correlation between moisture and carbohydrates. Data plotted extracted from Oboh, Ologhobo and Tewe (1989).	41
Figure 3.5: Linear correlation between moisture and Total Reducing Sugars (TRS). Data plotted with selected thirty-six samples date from Table 3.3. $R^2(\text{adj})$ means the R^2 adjusted with degrees of freedom.	44
Figure 3.6: Stoichiometry reaction of monosaccharides conversion into ethanol.	46
Figure 3.7: Ethanol potential in function of sweet potato moisture (x_{MST}) and concentration (x_{SWP} : 1 L of dilution water).	48
Figure 4.1: Processes of enzymatic hydrolysis employed, which were carried out after the prehydrolysis.	57
Figure 4.2: Tubes images after stirring (in α -amylase step), (a) fresh sweet potato and (b) sweet potato flour.	60

Figura 5.1: Metodologia empregada no estudo sobre o efeito da temperatura de liquefação na hidrólise.....	71
Figura 5.2: Metodologia empregada no estudo com aquecimento prévio em micro-ondas.	73
Figura 5.3: Imagem comparativa de experimentos com e sem a etapa de redução de viscosidade.....	74
Figura 5.4: Metodologia empregada no estudo de liquefação em micro-ondas.....	75
Figura 5.5: Metodologia experimental empregada no Estudo 4.	77
Figura 5.6: Dados cinéticos do processo de hidrólise simultâneo com a fermentação.....	78
Figure 6.1: Picture of sweet potato used in the experiments.	84
Figure 6.2: Layout of the procedure adopted in comparative study between raw and gelatinized starch.	85
Figure 6.3: Pictures of two erlenmeyers at zero time and after 24h of fermentation.	87
Figure 6.4: Kinetic data upon simultaneous hydrolysis and fermentation process.	88
Figure 6.5: Comparison between the methodologies of literature and the present study.	90
Figure 6.6: Model 2 plot: conversion efficiency as a function of time and temperature. ..	93
Figure 7.1: Sweet potato used in the experiments.	100
Figure 7.2: Layout of the procedure adopted in the comparative study between conventional and microwave heating..	101
Figure 7.3: Solid degradation occurring in the SHF process.....	103
Figure 7.4: Fermentation results are expressed in conversion efficiency (ε_{CONV}). Mean values that do not share the same letter are significantly different, according to the Tukey test with 95 % of confidence.	106
Figure 7.5: Process simulation for a day of production. Variables in blue were fixed and others were calculated..	109
Figure 7.6: Costs per litre of ethanol (HF), evaluating variations in moisture of sweet potato and in conversion efficiency in fermentation. Results were generated by simulating the model of Figure 7.5. It was considered that yeast was recycled 11 times. On the ordinate axis: conv = conventional heating method; mcw = microwave heating; and $T_2 = 76\text{ }^\circ\text{C}$	111
Figura 8.1: Modelo de destilação em batelada com injeção de CO_2	122
Figura 8.2: Fotografia do aparato experimental.	126
Figura 8.3: Comparação entre o modelo implementado com dados experimentais encontrados em Geankoplis (2003), x e y estão em frações molares.	127
Figura 8.4: Curvas de ELV para quarto frações molares de CO_2 no vapor.	128
Figura 8.5: Adição de CO_2 e resultados sobre y_{ET} no ponto azeotrópico.....	128
Figura 8.6: Mistura etanol-água, comparação entre os pontos experimentais produzidos neste estudo com a curva teórica.....	129
Figura 8.7: Medições de temperaturas no experimento com a mistura etanol-água.	129
Figura 8.8: Imagem da formação de gotas no percurso da condensação.	130
Figura 8.9: Evolução da temperatura ao longo dos experimentos, em três vazões distintas de CO_2 na mistura etanol-água- CO_2	130
Figura 8.10: Frações molares de etanol considerando a mistura ternária: etanol-água- CO_2 , nas três condições distintas de vazão de CO_2 . Por ter ficado fora do comportamento, o ponto (59,5; 0,13) da vazão de 9 L/min não foi conectado.....	133
Figura 8.11: Frações molares de etanol no experimento etanol-água- CO_2 , mas desconsiderando a fração molar de CO_2 (dados nas três vazões de CO_2)	133
Figura 8.12: Gráficos sobre a evolução da temperatura ao longo dos experimentos com vinho de batata-doce.	134

Figura 8.13: Vinho de batata-doce, antes do experimento de destilação e após.....	134
Figura 8.14: Resultado dos experimentos com vinho com duas vazões distintas de CO ₂ , a fração molar y_{ET} é apresentada considerando os três componentes no vapor (y_{ET} , y_{H2O} e y_{CO2}).....	135
Figura 8.15: Frações molares y_{ET} nos experimentos com vinho, mas desconsiderando a fração molar de CO ₂	136
Figura 9.1: Imagem comparativa de fermentação, sem processo de enzimático de redução de viscosidade e sólidos (a) e com (b).	143
Figura 9.2: Batatas selecionadas pela Embrapa pelo processo de limpeza clonal.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Consumo de energia e participação por fonte no Brasil.	3
Tabela 1.2: Produtividade média da cana-de-açúcar em t/ha.	4
Tabela 1.3: Quantidade em toneladas de cana-de-açúcar produzida no RS (2007 – 2014).	5
Tabela 1.4: Culturas temporárias e dados sobre suas produções no RS no ano de 2014. ...	6
Tabela 2.1: Resultados experimentais de uma planta piloto e industrial com emprego de uma xilanase para a redução da viscosidade.	29
Tabela 2.2: Resultados experimentais do estudo onde se produziu enzimas desintegrantes dos componentes da parede celular a partir de <i>P. ochrochloron</i> Biourge.	30
Table 3.1: Moisture, sugars and starch in six genotypes of sweet potatoes, according to Zhang, Wheatley and Corke (2002). All data are on wet basis.	40
Table 3.2: Average composition of forty-nine sweet potatoes (data on wet basis).	41
Table 3.3: Centesimal composition of seventy-three sweet potatoes from five countries in Pacific (data on a wet basis). TRS were calculated in the present work.	42
Table 3.4: Comparison between TRS estimation applying Eq. (3.3) and experimental results.	45
Table 4.1: Summary of what was investigated in this study.	55
Table 4.2: Results of stage 1. Total glucose content, given in % (w/w) and in wet basis. CV is also given in %.	60
Table 4.3: Results of stage 2. Total glucose content, given in % (w/w) and in wet basis. CV is also given in %.	61
Table 4.4: Results of stage 3. Total glucose content, given in % (w/w) and in wet basis. CV is also given in %.	62
Tabela 5.1: Resumo descritivo das enzimas testadas, segundo informações dos fabricantes.	69
Tabela 5.2: Resultados do estudo sobre o efeito da temperatura de liquefação na hidrólise.	72
Tabela 5.3: Produção de etanol em diferentes condições de processos.	74
Tabela 5.4: Resultados de produção de etanol, onde em um experimento houve a adição da Optimash BG e em outro não.	78
Tabela 5.5: Resultados de glicose residual, onde em um experimento houve a adição da Optimash BG e em outro não.	78
Table 6.1: Comparative results between sweet potato uncooked and cooked, concerning conversion efficiencies: ε_{CONV} (%).	88
Table 6.2: Factors and variations to the central composite design.	91
Table 6.3: The results of the central composite experiment design. The efficiencies above 90% are highlighted.	91
Table 6.4: Models construction and optimization, having ε_{CONV} as variable predicted. ...	92
Table 7.1: Fermentation results comparing water bath and microwave methods over 39 days after sweet potato harvest.	105
Table 7.2: Considered costs for the inputs.	107
Table 7.3: Simulation parameters and factors.	108
Table 7.4: Results of costs per litre of ethanol-hydrated fuel, considering different scenarios.	110
Tabela A1: Custos considerados para as entradas.	116
Tabela A2: Resultados dos custos por litro de etanol hidratado combustível, considerando diferentes cenários.	117
Tabela A3: Comparações entre os custos da análise no artigo com a análise atualizada.	117

Tabela 8.1: Extração de etanol por esgotamento com CO ₂ . Resultados experimentais: Concentração de etanol no extraído (CE), Volume extraído (VE) e Etanol Recuperado (ER).	122
Tabela 8.2: Constante de Henry (atm) para o CO ₂ em etanol-água em diferentes temperaturas e composições.	124
Tabela 8.3: Ajuste dos parâmetros para a Eq. 8.9.....	125
Tabela 8.4: Misturas estudadas nos experimentos.....	125
Tabela 8.5: Comparações entre resultados experimentais com os calculados com o modelo - $V_{CO_2} = 4,6$ L/min.	132
Tabela 8.6: Comparações entre resultados experimentais com os calculados com o modelo - $V_{CO_2} = 6,8$ L/min.	132
Tabela 8.7: Comparações entre resultados experimentais com os calculados com o modelo - $V_{CO_2} = 9$ L/min.	132
Tabela 9.2: Cenários de produção de 1000 L etanol/dia considerando as batatas melhoradas pela Embrapa.	144

NOTAÇÃO E SIMBOLOGIA

Abreviações

a.a.	ao ano
ACIAR	Australian Centre for International Agricultural Research
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ART	Açúcares Redutores Totais
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
conv	conventional (heating)
db	dry basis
DDG	Distillers Dried Grains
DDGS	Distillers Dried Grains with Solubles
DIPE	Di-isopropil Éter
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EEC	Electrical Energy Consumed
EES	Engineering Equation Solver
EHC	Etanol hidratado combustível
ELV	Equilíbrio Líquido-Vapor
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
ETBE	Etil Terc-Butil Éter
GIMSCOP	Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (Engenharia Química/UFRGS)
GLP	Gás liquefeito de petróleo
GO	Goiás
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSF	Hidrólise Simultânea com a Fermentação
IRR	Internal Rate of Return
mcw	microwave
m/m	massa por massa
MME	Ministério de Minas e Energia
MTBE	Metil Terc-Butil Éter
NPV	Net Present Value

NREL	National Renewable Energy Laboratory (USA)
PVC	Polyvinyl Chloride
RID	Refractive Index Detector
RS	Rio Grande do Sul
SHF	Simultaneous Hydrolysis and Fermentation
SP	São Paulo
SSF	Sacarificação Simultânea com a Fermentação
SWP	Sweet Potato
TAME	Terc-Amil Metil Éter
TBA	Terc-Butanol
tep	tonelada equivalente de petróleo
TIR	Taxa Interna de Retorno
TRS	Total Reducing Sugars
VHG	Very High Gravity (fermentações)
VPL	Valor Presente Líquido
v/v ou v.v ⁻¹	volume por volume
vvm	volume de gás injetado por volume do meio, por minuto

Variáveis

c_p	Calor específico
CV	Coeficiente de Variação
EEC	Electrical Energy Consumed
\hat{f}	Fugacidade
H	Constante de Henry
m	Massa
q	Calor
R^2	Coeficiente de determinação
S	Desvio padrão
t	Tempo
T	Temperatura
v	Volume molar
x	Relativo à determinado fator, que é indicado com subscrito. Na análise de equilíbrio, refere-se à fração molar no líquido de determinada espécie química.

y Fração molar no vapor de determinada espécie química

Letras gregas

γ Coeficiente de atividade

Δ Relativo a alguma variação

ϵ Relativo à eficiência de determinado processo (indicado com subscrito)

λ Parâmetro relacionado à energia de interação

Subscritos/Sobrescritos

CONV Conversion

Exp Experimental

ET Etanol

ETH Ethanol

HF Hydrated Fuel

HTG Heating

HX Heat Exchanger

L Líquido

MST Moisture

sat Saturação

SWP Sweet Potato

Theor Theoretical

TRS Total Reducing Sugars

V Vapor

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Motivação

Diante do futuro esgotamento das reservas fósseis e ao latente problema do aquecimento global, a alternativa dos biocombustíveis tem sido estimulada no cenário mundial. Sendo de origem vegetal, o CO₂ consumido pela matéria-prima na fotossíntese compensa a emissão que é liberada durante o processo produtivo e combustão do biocombustível. No estudo de ciclo de vida energético de Wang *et al.* (2012), em relação à gasolina, a redução dos gases de efeito estufa foi de 34% para o etanol de milho e 51% para o de cana-de-açúcar. A principal razão para o valor do milho ser inferior ao da cana-de-açúcar se deve a uma maior emissão de gases de efeito estufa no processo de produção de etanol de milho.

O etanol pode ser utilizado diretamente como combustível na forma hidratada e na forma anidra é um aditivo oxigenado de mistura à gasolina. A adição de oxigênio é realizada para aumentar a octanagem e promover uma combustão mais completa, o que reduz a emissão de monóxido de carbono. Entre os aditivos oxigenados, o metil terc-butil éter (MTBE) é bastante comum, também existem: di-isopropil éter (DIPE), etil terc-butil éter (ETBE), terc-amil metil éter (TAME) e o terc-butanol (TBA). Considerando as opções de oxigenados, o etanol se decompõe mais rapidamente no ambiente e em geral é menos tóxico (NHDES, 2009). No Brasil, conforme a Lei 13.033 de 24 de setembro de 2014, o Poder Executivo pode estabelecer que o percentual de etanol anidro na gasolina seja de 18 – 27,5%, sendo que em março de 2015 o percentual passou de 25% para 27% para as gasolinas comum e aditivada, a premium seguiu com o percentual de 25% (Brasil, 2014; Amato e Matoso, 2015).

Sobre o cenário energético mundial, o petróleo, o carvão e o gás natural juntos suprem cerca de 82% da demanda (Gupta e Verma, 2015). Com relação à participação do etanol, pode-se ter uma estimativa a partir dos dados de biocombustíveis publicados em EIA (2014). Dos combustíveis líquidos produzidos mundialmente no ano de 2010 os biocombustíveis representaram apenas 1,5% e, no cenário estabelecido como referência, a projeção é que em 2025 a participação aumente para 2,1% e em 2040 para 2,5%. Dada a predominância dos combustíveis de origem fóssil, o interesse nos biocombustíveis não

se deve apenas ao apelo ambiental, mas também pela redução da dependência dos recursos fósseis, cujas reservas se encontram concentradas em determinadas regiões.

Outro ponto que se tem argumentado em favor dos biocombustíveis é o fortalecimento da economia rural, mas também há o debate da competição com os alimentos. Neste contexto, com as melhorias de cultivo e aumento da produtividade agrícola é factível, em uma mesma área, a produção satisfatória tanto para a alimentação quanto para biocombustíveis. Deve-se considerar também os coprodutos gerados com os biocombustíveis, que podem ser empregados na alimentação animal e, por conseguinte, na alimentação humana. Além disto, também é possível o aproveitamento da matéria-prima que não atender aos critérios de qualidade para o consumo humano. Sobre o preço final do alimento, o custo do combustível é um fator muito influente, uma participação mais competitiva dos biocombustíveis frente aos combustíveis de origem fóssil seria bastante positivo na redução do preço dos alimentos (RFA, 2011).

Os Estados Unidos e o Brasil se destacam isoladamente na produção mundial de etanol, outros países contribuem com volumes pouco expressivos. No ano de 2013 os Estados Unidos, a partir do milho, contribuíram com 57,68% da produção e o Brasil com 29,24%, a partir da cana-de-açúcar (Gupta e Verma, 2015). No Brasil, de todo etanol produzido a maior parte tem se destinado ao consumo interno, e se espera que continue assim nos próximos anos, como pode ser visto na Figura 1.1, onde uma pequena parcela se refere à exportação. A modesta projeção da exportação é justificada por crises econômicas, ao tradicional protecionismo de mercado e também às restrições de oferta de etanol no Brasil (MME/EPE, 2015).

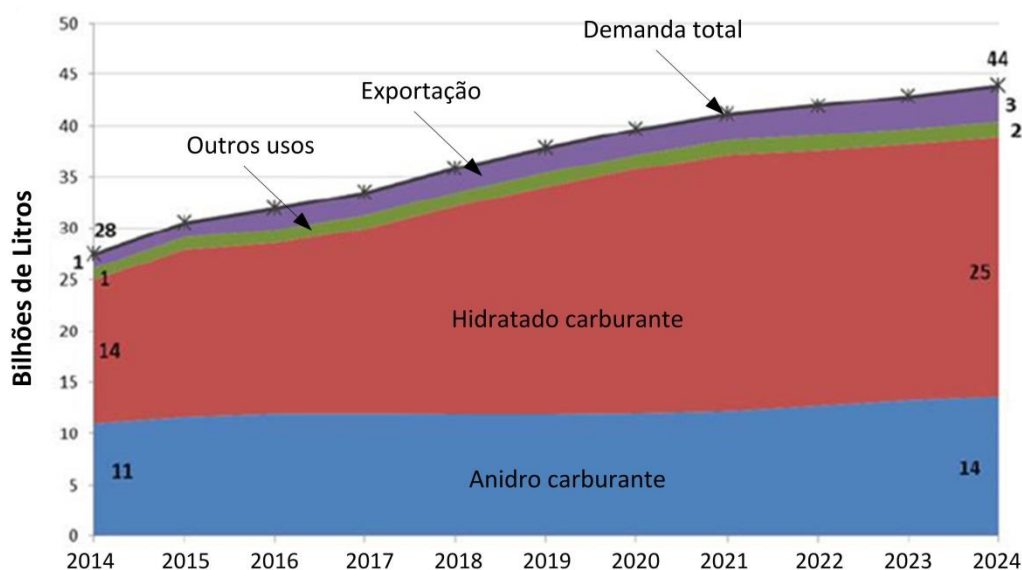


Figura 1.1: Demanda de etanol no Brasil entre 2014 – 2015 e projeção até 2024.
FONTE: MME/EPE (2015).

Dentre as diferentes fontes de energia no Brasil, em 2015 a fatia do consumo referente ao etanol foi de 5,7%, e se espera que este valor aumente para 6,2% em 2024, segundo o segundo o Plano Decenal de Expansão de Energia 2024 (MME/EPE, 2015). Demais dados de consumo e projeções podem ser vistos na Tabela 1.1.

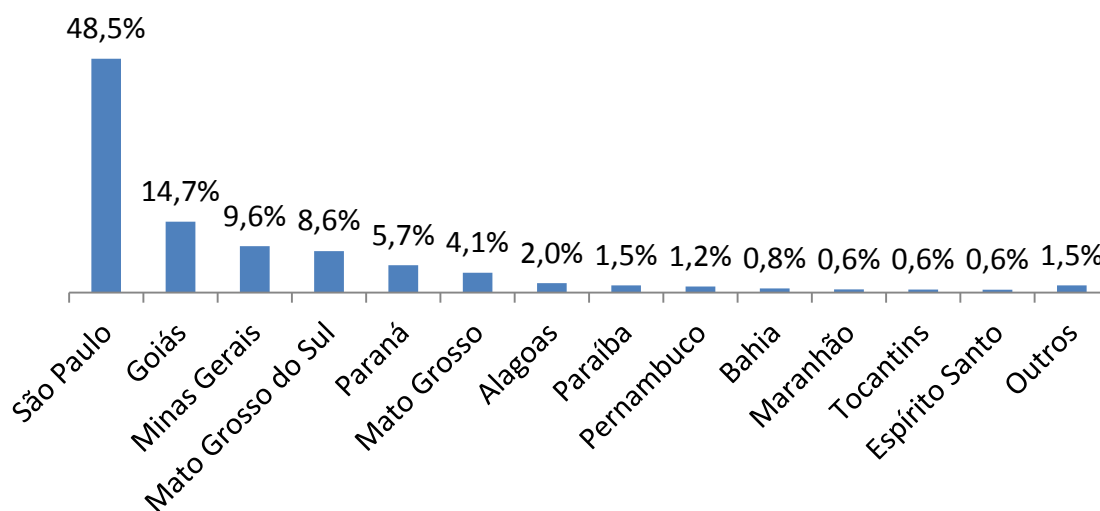
Tabela 1.1: Consumo de energia e participação por fonte no Brasil.

Fonte	2015		2024		2014 - 2024 Crescimento (% a.a.)
	Mil tep ^a	%	Mil tep	%	
Gás natural	19.799	7,4	26.587	7,5	3,5
Carvão mineral e coque	13.050	4,9	17.330	4,9	2,5
Lenha	15.019	5,6	16.809	4,8	0,1
Carvão vegetal	4.146	1,6	5.506	1,6	3,3
Bagaço de cana	29.191	11,0	37.786	10,7	2,8
Eletricidade	45.173	17,0	68.014	19,2	4,1
Etanol	15.303	5,7	21.795	6,2	4,8
Biodiesel	3.372	1,3	4.302	1,2	7,0
Outros	6.498	2,4	11.410	3,2	5,2
Derivados de petróleo	114.765	43,1	143.959	40,7	2,2
Óleo diesel	48.881	18,4	63.090	17,8	2,8
Óleo combustível	3.627	1,4	4.628	1,3	1,3
Gasolina	24.794	9,3	27.705	7,8	0,7
GLP	8.554	3,2	9.972	2,8	1,8
Querosene	3.661	1,4	5.164	1,5	3,5
Outros derivados	25.249	9,5	33.401	9,4	2,4
Consumo final de energia	266.315	100	353.498	100	2,9

FONTE: MME/EPE (2015).

^atep: tonelada equivalente de petróleo.

A produção de etanol no Brasil está concentrada em determinados Estados, onde São Paulo se destaca majoritariamente, como pode ser visto na Figura 1.2. Isto ocorre devido às condições climáticas e de relevo favoráveis ao plantio da cana-de-açúcar, bem como ao desenvolvimento econômico e avanço industrial no beneficiamento.

**Figura 1.2:** Distribuição da produção de etanol no Brasil por Estado^a.

FONTE: UNICA (2016).

^aDados considerando as produções das safras 2014/2015.

Até este momento foram abordadas questões referentes ao etanol de maneira mais ampla, no sentido de justificar o interesse global e também apresentar como esse biocombustível está inserido tanto no mercado mundial como no brasileiro. Na sequência o foco é o cenário do etanol no Rio Grande do Sul, pois o presente trabalho teve origem em um projeto concebido no GIMSCOP^a, com o objetivo da viabilização da produção no Estado, propondo a matéria-prima e o processo.

A produção de etanol RS está muito aquém da demanda, em 2015, o consumo automobilístico de etanol anidro e de hidratado combustível (EHC) no RS foi de 929 e 168 milhões de litros, respectivamente. Para a produção do plástico verde (polietileno) e do aditivo ETBE, a unidade industrial da Braskem em Triunfo consome em média anualmente 700 milhões de litros. Com tais números, pode-se estimar uma demanda total no entorno de 1.797 milhões de litros, para um Estado que atualmente não produz mais que 8 milhões (Braskem, 2016; Unica, 2016).

Dados os fatos, o RS é essencialmente um comprador de etanol dos demais estados, levando à desvantagem de um produto mais caro ao consumidor e também o governo deixa de arrecadar tributação com ICMS. Em SEAPA (2014) há uma estimativa de que o valor arrecadado com esta tributação ficaria na ordem de R\$ 300 milhões/ano. Todo este cenário evidencia o mercado oportuno para a produção local de etanol, mas para isto também deve haver disponibilidade suficiente de matéria-prima.

Uma boa produtividade para a cana-de-açúcar é na ordem de 80 t/ha, e esta tem sido a média alcançada nos estados que lideram a produção de etanol. Já no RS, as condições edafoclimáticas não favorecem o cultivo da cultura, sendo um dos motivos para a baixa produtividade média que se tem observado no Estado. A Tabela 1.2 apresenta estes dados, informados pelo IBGE (2016) considerando o ano de 2007 até 2014.

Tabela 1.2: Produtividade média da cana-de-açúcar em t/ha.

Estado	Ano							
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
SP	84,6	85,2	85,4	85,5	82,1	78,9	80,4	72,1
GO	80,5	82,6	83,4	82,9	78,7	79,6	80,6	78,6
RS	39,9	38,9	34,3	41,9	42,4	32,1	40,7	42,4

FONTE: IBGE (2016).

Deve-se enfatizar que a produtividade média considera toda a cana produzida no Estado, existem regiões no RS em que a produtividade é mais elevada, podendo inclusive atingir 80 t/ha, mas se estima que apenas 1,5% da área total destinada à lavoura é altamente apta para a cultura (Masiero, 2012), sendo um fator influente para a redução da produtividade média. Pode-se ter uma ideia sobre a distribuição da produtividade da cana-de-açúcar no RS através do histograma apresentado na Figura 1.3.

^a Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos do Departamento de Engenharia Química da UFRGS.

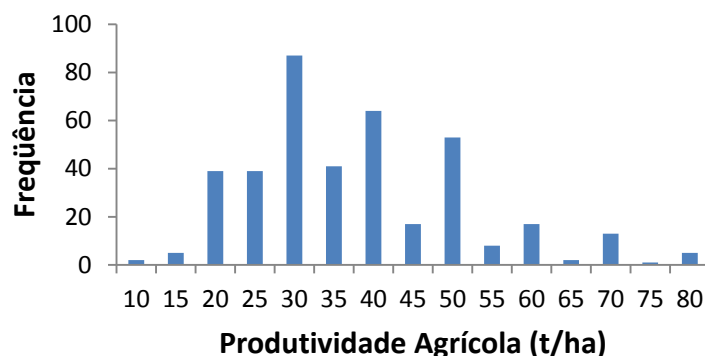


Figura 1.3: Produtividade agrícola da cana-de-açúcar no RS, dados de 2014 da produtividade de 393 municípios gaúchos.
 FONTE: IBGE (2016).

É importante mencionar que em 2012 a Embrapa emitiu um Comunicado Técnico indicando nove variedades de cana-de-açúcar para o cultivo no Rio Grande do Sul, sendo que os genótipos indicados apresentaram produtividade média na ordem de 85 t/ha e bom comportamento em condições de estresse por frio e estiagem (Silva *et al.*, 2012). Apesar dos bons resultados apresentados no estudo, a quantidade de cana-de-açúcar produzida no Estado parece permanecer estável, como pode ser visto na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Quantidade em toneladas de cana-de-açúcar produzida no RS (2007 – 2014).

Ano							
2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
1.426.978	1.431.081	1.254.475	1.504.692	1.384.967	981.594	1.126.122	1.043.336

FONTE: IBGE (2016).

Sobre outras matérias-primas, no GIMSCOP Masiero (2012) realizou um estudo comparando quatro possibilidades: sorgo sacarino, mandioca, batata-doce e cana-de-açúcar, tendo em vista a viabilidade de microusinas de etanol no RS (capacidade 1000 L/dia). A pesquisa abrangeu o levantamento de dados teóricos, de produtividade no Estado (t/ha), concentração de açúcares, concentração de amido nas matérias-primas amiláceas e custos de produção. Após a análise dos indicadores financeiros Valor Presente Líquido (VPL), Taxa Interna de Retorno (TIR) e tempo de retorno do investimento, Masiero (2012) concluiu que o sorgo sacarino e a batata-doce eram as matérias-primas mais viáveis (nesta análise a produtividade da cana-de-açúcar foi assumida como 50 t/ha).

Como o processo de produção a partir do sorgo sacarino já se encontra mais maduro, no GIMSCOP a batata-doce foi selecionada para a continuidade da pesquisa. As produtividades médias dessa cultura no país e no RS são baixas, ambas aproximadamente 13 t/ha de raízes (mais detalhes sobre a produtividade gaúcha podem ser vistos na Figura 1.4) (IBGE, 2016). Contudo, a Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS), atuando junto aos produtores para o melhoramento do material genético, adequando as práticas de cultivo, principalmente na etapa de produção de mudas, lançou em 2011 alguns

cultivares que apresentaram produtividade média de 40 t/ha, podendo atingir 60 t/ha (Masiero, 2012). Masiero (2012), em seu estudo considerou a produtividade de 40 t/ha.

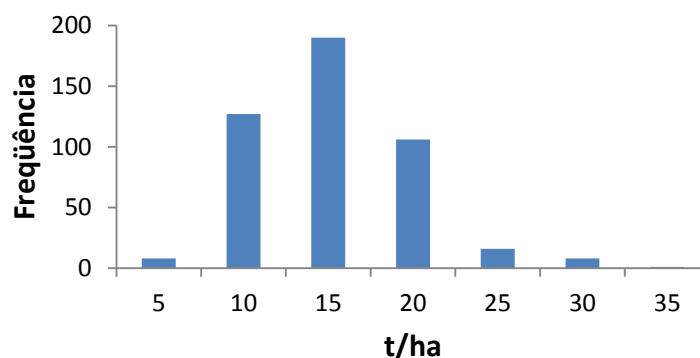


Figura 1.4: Histograma sobre a produtividade da batata-doce no RS, o gráfico foi construído com dados de 2014 da produtividade de 456 municípios gaúchos. FONTE: IBGE (2016).

Dentre as culturas temporárias de maior produção no RS, em 2014 a batata-doce ocupou a 12ª posição, onde a quantidade de batata-doce produzida representou 0,49% do total, dados sobre as culturas que lideraram podem ser vistos na Tabela 1.4. Contudo, o RS se destaca na produção nacional de batata-doce, no ano de 2014 deteve 31% da produção, o segundo maior produtor foi São Paulo (14%), e Paraná e Sergipe ocuparam a terceira posição (8%) (IBGE, 2016).

Tabela 1.4: Culturas temporárias e dados sobre suas produções no RS no ano de 2014.

Cultura	Posição no ranking	% da produção
Soja	1	39,87
Arroz	2	25,20
Milho	3	16,48
Trigo	4	5,11
Batata-doce	12	0,49

FONTE: IBGE (2016).

Para a produção de etanol, o interesse na batata-doce abrange pesquisas em outros países, a exemplo dos trabalhos de Cao *et al.* (2011), Dewan *et al.* (2013), Duvernay, Chinn e Yencho (2013), Lareo *et al.* (2013), Srichuwong *et al.* (2012) e Zhang *et al.* (2011), tais trabalhos são abordados mais detalhadamente na Revisão Bibliográfica desta tese (Capítulo 2).

Não só o elevado teor de amido tem pontuado a favor da batata-doce mas também determinadas características agronômicas, tais como: crescimento em solos pobres, resistência à seca, alta taxa de multiplicação, curto ciclo de crescimento, baixa incidência de doenças e pragas, cobertura rápida do solo e, portanto, protege-o contra chuvas erosivas e contribui no controle de plantas daninhas (Lareo *et al.*, 2013). Como coprodutos, a parte aérea pode ser empregada na alimentação animal, também existem

pesquisas que buscam extrair substâncias de alto valor agregado das folhas, entre elas estão as antocianinas e os polifenóis, que possuem efeitos benéficos como a proteção contra obesidade e hiperglicemia (Masiero, 2012).

No GIMSCOP, em 2011 foram iniciados os experimentos de produção de etanol com a batata-doce, objetivando viabilizar tecnicamente as condições que na análise teórica foram constatadas como viáveis financeiramente.

Masiero (2012) realizou seus ensaios com a batata *in natura*, utilizando a enzima amilolítica Stargen 002, da Genencor, desenvolvida para atuar sobre o amido na forma granular, mas, sob a recomendação de um pré-tratamento em temperaturas entre 49 – 63°C, no estudo em questão o pré-tratamento foi de 1h a 52°C, com uma relação de batata por litro de água de diluição de 0,2:1 (kg:L). Também foi utilizada uma elevada quantidade de enzima (26,2 µL/g de batata *in natura*) para a obtenção de uma eficiência de fermentação de 78,2%^a. O processo fermentativo se encerrou em 48 h, resultando em uma concentração de etanol de 2,7% (v/v). Aplicando os resultados experimentais na análise financeira o processo se tornou inviável, principalmente devido à elevada dosagem de enzima, com um custo 241 % superior ao teórico.

Risso (2014) deu sequência ao trabalho de Masiero (2012), concentrando sua pesquisa no pré-processamento da matéria-prima, onde a batata foi seca e depois moída, produzindo uma farinha. Risso (2014) estudou diferentes métodos de secagem: estufa com circulação forçada de ar a 60°C, estufa a 60°C, estufa a 105°C, secagem ao sol, micro-ondas e liofilização. Dentre os métodos testados, o que se demonstrou mais promissor, em termos de rendimento na hidrólise, custo e praticidade de operação foi o de secagem em micro-ondas. Portanto, na segunda etapa de seu estudo, Risso (2014) realizou o processo fermentativo utilizando o pré-processamento de secagem com micro-ondas. Risso (2014) trabalhou com a concentração de farinha de 0,14:1 (kg:L), o que equivale a 0,565:1 (kg:L) de batata *in natura*, a dosagem da enzima Stargen foi reduzida para 3 µL/g de farinha (equivalente a 1 µL/g de batata *in natura*). Como resultado, obteve uma produção de etanol de 4,75% (v/v), com o processo fermentativo encerrando em 24h e eficiência de fermentação de 72,2%. Embora tenha havido uma pequena queda na eficiência em relação ao trabalho de Masiero (2012), os ganhos foram significativos: redução de 96% da dosagem enzimática e 50% no tempo de fermentação, e, aumento de 183% da concentração de batata no mosto e 76% no teor de etanol.

O trabalho de Risso (2014) já consistiu em um importante avanço em relação ao trabalho de Masiero (2012). No entanto, ainda ficou margem para o aprimoramento, como o aumento da concentração de etanol no vinho, redução de custos de uma maneira geral e mudanças no processo a fim de torná-lo mais prático e eficiente.

1.2 Objetivos

Considerando os pontos favoráveis ao etanol, questões ambientais e a redução da dependência dos combustíveis de origem fóssil, trabalhos que fomentem a produção de

^a Eficiência calculada como: $[\text{Etanol produzido}] / [(\text{ART}_{t=0} - \text{ART}_{t=\text{final}}) * (\text{relação estequiométrica})]$. Os açúcares redutores totais (ART) no tempo zero foram calculados pelas análises de caracterização da batata: teor de glicose, frutose mais a glicose proveniente do amido.

desse biocombustível sempre terão importante contribuição a nível global, ressaltando o quanto baixa ainda é a produção de etanol no mundo.

Apesar de o Brasil ocupar a segunda posição na produção mundial de etanol, ainda há espaço para uma significativa expansão no mercado, onde se espera que o consumo em 2024 cresça para 22 mil tep, enquanto que em 2015 foi 15 mil tep (Tabela 1.1). O RS possui dependência praticamente exclusiva do etanol externo, para a mudança deste quadro é necessário que haja disponibilidade suficiente de matéria-prima, e em estudos prévios a batata-doce se demonstrou como uma alternativa interessante.

Visando colaborar, fornecendo conteúdo científico no contexto apresentado, o presente trabalho tem por objetivo apresentar um método de produção de etanol a partir de batata-doce, considerando os seguintes objetivos específicos:

- **O1:** Estudo de diferentes métodos de hidrólise do amido e quantificação de glicose, visando identificar as alternativas mais práticas, econômicas e que levam aos resultados mais acurados;
- **O2:** Desenvolver um processo prático com simplificação de etapas;
- **O3:** Atingir rendimento e eficiência satisfatórios: teor de etanol no vinho entre 10 – 12% (v/v), que é o intervalo geralmente observado nas usinas no mundo, e eficiência de conversão em etanol no em torno de 90%;
- **O4:** Avaliar os custos do processo e identificar os fatores mais significativos;
- **O5:** Identificar os potenciais e possíveis dificuldades na escala industrial, visando a produção descentralizada em microusinas. No caso das possíveis dificuldades, objetiva-se a caracterização e proposta de soluções;
- **O6:** Análise teórico-experimental do comportamento do sistema na separação do etanol da mistura etanol-água-CO₂ e de um vinho de batata-doce.

1.3 Estrutura do trabalho

O trabalho está fundamentalmente organizado em artigos, os quais compõem diferentes partes abrangidas neste trabalho, sendo elas: Caracterização da matéria-prima; Processo fermentativo; Pós-processamento: separação do etanol e; O modelo de biorrefinarias de batata-doce e projeção de cenários.

A estruturação do trabalho pode ser melhor compreendida através dos tópicos que seguem.

- **Capítulo 1:** Introdução do trabalho; que foi elaborada visando apresentar o cenário do tema abordado e o estágio da pesquisa, justificando a iniciativa deste trabalho e o estabelecimento dos objetivos. A introdução também contém subseções que foram inseridas com o propósito de fornecer ao leitor uma maior compreensão sobre a organização do trabalho, assim como suas principais contribuições;
- **Capítulo 2:** Revisão bibliográfica; que foca sobre o assunto “Produção de Etanol a partir de Amiláceas” apresentado conceitos fundamentais que constituem a base do estudo técnico;

Parte I – Caracterização da matéria-prima

- **Capítulo 3:** Artigo 1; onde é proposto um método alternativo para estimar o teor de açúcares redutores totais (ART) na batata-doce através de sua umidade. Sendo, ART: monossacarídeos contidos nos açúcares livres somados à glicose proveniente do amido;
- **Capítulo 4:** Artigo 2. Foi desenvolvido um estudo comparativo entre diferentes métodos de hidrólise do amido e de quantificação de glicose, considerando as hidrólises ácida e enzimática. Tal estudo foi motivado pela busca por um método confiável, prático e econômico, pois a análise de ART é importante tanto para a avaliação de resultados fermentativos, quanto para a construção da curva ART x umidade proposta no artigo 1;

Parte II – Processo fermentativo

- **Capítulo 5:** É apresentada uma sequência de quatro estudos de hidrólise e fermentação, levando à definição das condições e processos operacionais básicos do processo;
- **Capítulos 6 e 7:** Artigos 3 e 4, respectivamente. Determinada a estrutura básica do processo, para aperfeiçoá-lo mais experimentos foram realizados, dando origem aos artigos desses capítulos;

Parte III – Pós-processamento: separação do etanol

- **Capítulo 8:** Artigo 5. Visando um futuro processo de destilação com injeção de CO₂, neste artigo é apresentado um estudo inicial, com a avaliação teórico-experimental do equilíbrio da mistura água-etanol-CO₂, também há o estudo experimental da injeção de CO₂ em um vinho de batata-doce;

PARTE IV – O modelo de biorrefinarias de batata-doce e projeção de cenários

- **Capítulo 9:** É um artigo que foi escrito para publicação em um jornal comum, visando transmitir aos leitores de diferentes formações e graus de instrução um panorama geral e simplificado do potencial da batata-doce como matéria-prima para a produção de etanol, os avanços obtidos na pesquisa do GIMSCOP e principais desafios que a pesquisa ainda se depara;
- **Capítulo 10:** Conclusões e sugestões para trabalhos futuros; onde são retomados os objetivos estabelecidos e são comentados de acordo com os resultados obtidos, seguidos das conclusões gerais e, por fim, são sugeridos temas para trabalhos futuros.

1.4 Contribuições

Podem-se listar como principais contribuições deste trabalho os pontos a seguir:

- **C1:** Identificação da relação matemática entre o teor de amido (ou açúcares redutores totais) com a umidade da batata-doce. Com isto se propõe um método simples para predizer o potencial teórico de etanol de uma dada fermentação;
- **C2:** Nos estudos sobre métodos analíticos para a quantificação de glicose total, ficou clara a superioridade dos resultados da batata-doce fresca sobre a farinha da batata seca. Com o kit de quantificação enzimática comercial da Megazyme, foram obtidos os maiores teores de glicose, mas sem diferença significativa da hidrólise ácida;
- **C3:** Método de aquecimento apenas para a batata-doce, levando a uma redução do consumo energético (quando na comparação com o processo usualmente adotado);
- **C4:** Proposta de três processos em um: hidrólise completa, fermentação e redução da viscosidade;
- **C5:** Redução do tempo de fermentação de 24h para 19h;
- **C6:** O amadurecimento da batata-doce se destaca positivamente no processo de hidrólise do amido;
- **C7:** A matéria-prima e a levedura (se não reciclada) são os insumos que se destacam no custo final do etanol;
- **C8:** A elevada quantidade de sólidos no final da fermentação foi identificada como um importante fator de potencial dificuldade na escala industrial;
- **C9:** Com o emprego do CO₂ para a separação do etanol, constatou-se que a temperatura de mudança de fase é reduzida, podendo levar a uma economia energética no processo.

1.5 Resumo gráfico

Visando demonstrar graficamente como os objetivos, os capítulos e as contribuições deste trabalho se interligam, a Figura 1.5 foi construída conectando tais pontos.

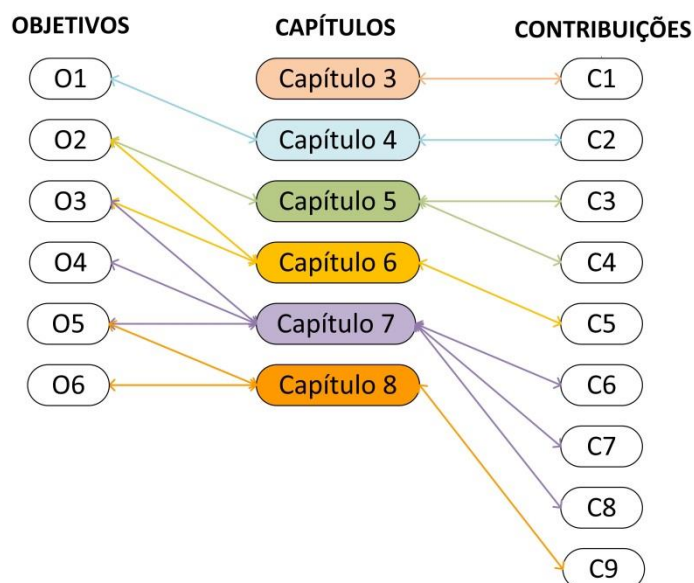


Figura 1.5: Resumo gráfico: conexões entre os objetivos, capítulos e contribuições.

1.6 Referências

AMATO, F.; MATOSO, F. Mistura de etanol na gasolina sobre hoje. **G1 Economia**, 16 março 2015. Disponível em: < <http://g1.globo.com/economia/noticia/2015/03/mistura-de-etanol-na-gasolina-sobe-hoje.html> >.

BRASIL. Lei 13.033 de 24 de setembro de 2014. 2014. Disponível em: < <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu> >.

BRASKEM. O etanol. 2016. Disponível em: < <http://www.braskem.com.br/site.aspx/Etanol> >. Acesso em: 03 março 2016.

CAO, Y. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato powder for the production of ethanol under conditions of very high gravity. **Front Chem Sci Eng**, v. 5, n. 3, p. 318-324, 2011.

DEWAN, A. *et al.* Saccharification and Fermentation of Waste Sweet Potato for Bioethanol Production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 6, p. 739-747, 2013. ISSN 1745-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12042> >.

DUVERNAY, W. H.; CHINN, M. S.; YENCHO, G. C. Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Ind Crop Prod**, v. 42, p. 527-537, 2013.

EIA. International Energy Outlook 2014 Washington, 2014. Disponível em: < [www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484\(2014\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484(2014).pdf) >.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, n. 0, p. 550-567, 1// 2015. ISSN 1364-0321. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114007084> >.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. 2016. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/> >. Acesso em: 04 março 2016.

LAREO, C. *et al.* Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 493, 2013. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.springerplus.com/content/2/1/493> >.

MASIERO, S. S. **Microusinas de etanol de batata-doce: viabilidade econômica e técnica**: Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012.

MME/EPE. **Plano Decenal de Expansão de Energia 2024**. Brasília: Ministério de Minas e Energia e Empresa de Pesquisa Energética (MME/EPE), 2015.

NHDES. **Environmental Fact Sheet**. Gasoline Oxygenate Additives: Health Information Summary. New Hampshire: New Hampshire Department of Environmental Services (NHDES) 2009.

RFA. Policy Positions: Food vs. Fuel. 2011. Disponível em: < <http://www.ethanolrfa.org/pages/policy-positions-food-vs-fuel> >.

RISSE, R. D. S. **Etanol de Batata-doce: Otimização do Pré-processamento da Matéria-prima e da Hidrólise Enzimática**. Porto Alegre: Dissertação de mestrado em engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2014.

SEAPA. **Programa Estadual de Produção de Amiláceas para Etanol - RS Mais Etanol**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura Pecuária e Agronegócio (SEAPA/RS) 2014.

SILVA, S. D. D. A. E. *et al.* **Comunicado Técnico 292**. Recomendação de Variedades de Cana-de-açúcar para o Estado do Rio Grande do Sul. Embrapa, 2012.

SRICHUWONG, S. *et al.* Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 120-127, 2012. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84857791562&partnerID=40&md5=f9a48974cef716e947fe10f1e8c54bb3> >.

UNICA. UNICADATA. 2016. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/> >. Acesso em: 03 março 2016.

WANG, M. *et al.* Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. **Environmental Research Letters**, v. 7, n. 4, 2012. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84871847228&partnerID=40&md5=0c9d57245fb632ea1234cf00a804cb8f> >.

ZHANG, L. *et al.* Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4573-4579, 2011. ISSN 09608524 (ISSN). Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79551690009&partnerID=40&md5=1e8e3fa41ed909deb3a4c9add3e2a7d3> >.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica: Produção de Etanol a partir de Amiláceas

2.1 O amido

O amido é um carboidrato encontrado na natureza como a reserva energética mais importante no reino vegetal. Quimicamente o amido é uma macromolécula, um polímero de unidades de glicose conectadas através de ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 (Figura 2.1).

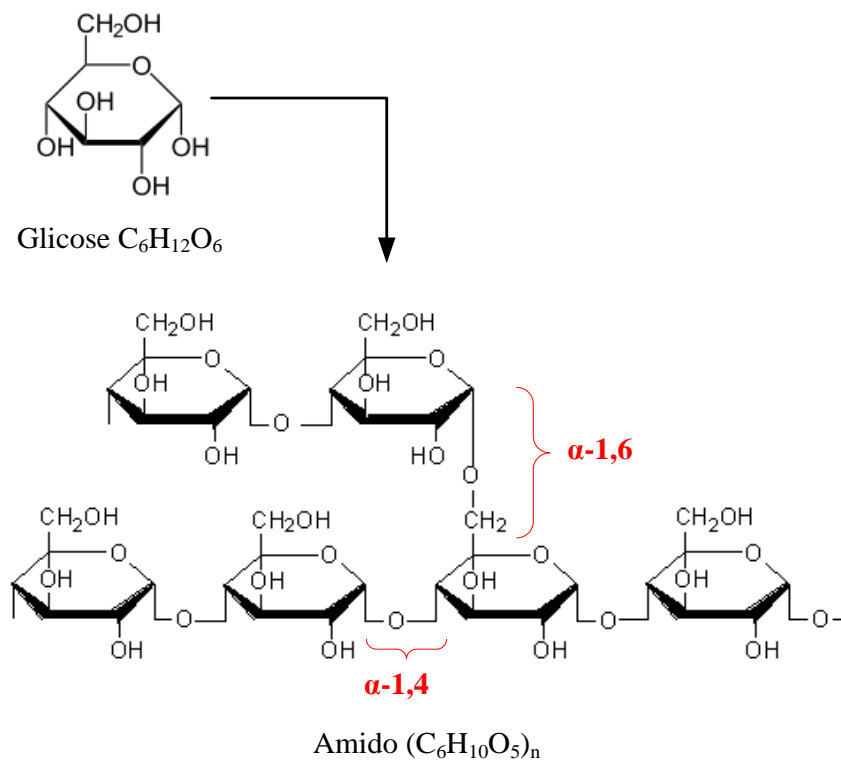


Figura 2.1: Estrutura molecular do amido.

FONTE: Adaptado de Royal Society of Chemistry (2014).

Dois tipos de cadeia compõem o amido: amilose e amilopectina. A amilose é uma cadeia essencialmente linear, caracterizada pelas ligações α -1,4. As ligações α -1,6, que conferem a característica ramificada, encontram-se em baixa proporção na amilose (entre 0,1% e 2,2%). Esta molécula possui número médio de grau de polimerização entre 500-5000 resíduos de glicose. A amilopectina é a componente ramificada do amido, as ligações α -1,6 encontram-se na ordem de 4% a 6%, e o grau de polimerização fica entre 4700 a 12800 (Denardin e Silva, 2009).

A amilopectina é, estrutural e funcionalmente, a mais importante das duas frações, pois sozinha é suficiente para formar o grânulo, como ocorre em mutantes que são desprovidos de amilose (Oliveira, 2011). Geralmente os amidos contêm 70 a 85% de amilopectina e 15 a 30% de amilose (Muccillo, 2009).

O amido é encontrado nos vegetais sob a forma de grânulos, a configuração e tamanho variam de acordo com a fonte botânica. Conforme o estudo de Leonel (2007), o amido de batata-doce apresentou forma circular poliédrica (Figura 2.2) com diâmetro médio aproximado de 18 μ m.

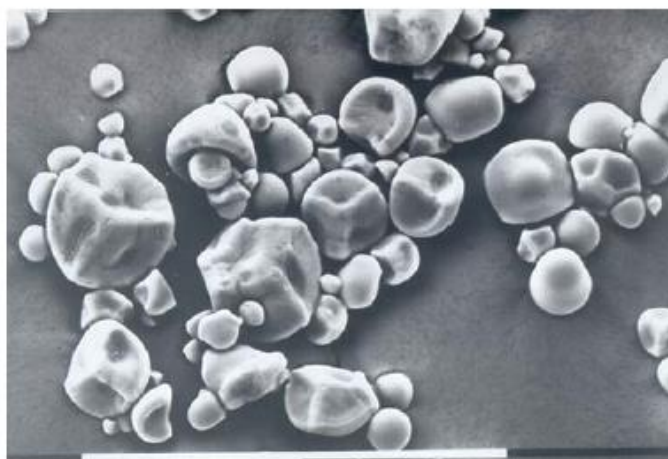


Figura 2.2: Imagem do grânulo de amido de batata-doce. Escala de 0,1 mm.
FONTE: Leonel (2007).

Os grânulos se desenvolvem a partir de um ponto de nucleação, denominado de hilum. No entorno do hilum a estrutura se dá na forma de anéis concêntricos, conhecidos como anéis de crescimento (Figura 2.3). Entre os anéis de crescimento há a alternância de regiões cristalinas e amorfas, motivo pelo qual o amido é frequentemente descrito como um polímero semicristalino. Os grânulos de amido nativos contêm entre 15% e 45% de material cristalino, de acordo com difração de raios-X (Denardin e Silva, 2009).

A cristalinidade é especialmente associada à amilopectina. No estado cristalino, as cadeias estão densamente compactadas por pontes de hidrogênio (intra- e intermolecular), ocorrendo a formação de duplas hélices. Tal estruturação confere resistência a tratamentos químicos e enzimáticos. A região amorfa, menos ordenada, contém os pontos de ramificação das cadeias laterais da amilopectina e possivelmente alguma amilose (Beninca, 2008; Denardin e Silva, 2009; Martín e López, 2009).

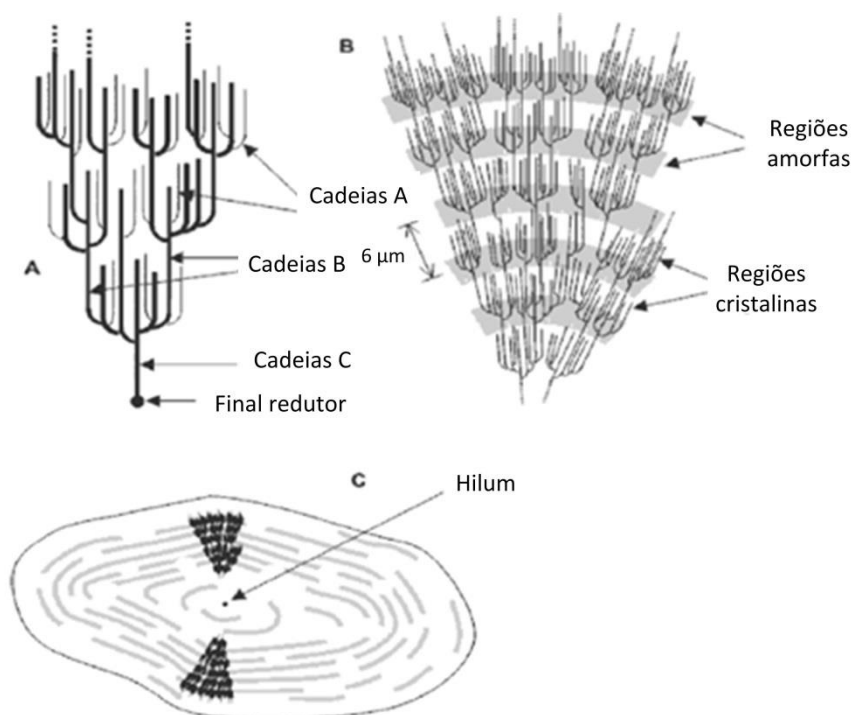


Figura 2.3: (A) Classificação das cadeias de amilopectina em tipo A, B e C. (B) Estrutura da amilopectina formando regiões amorfas e cristalinas. (C) Modelo de estrutura interna do grânulo, com a visualização dos anéis de crescimento e do hilum.

FONTE: Adaptado de Parker e Ring (2001) apud Denardin e Silva (2009).

Sobre a amilose, sua localização exata dentro do grânulo ainda não é clara, acredita-se que esteja localizada entre as cadeias da amilopectina, aleatoriamente entremeadas entre as regiões amorfas e cristalinas. Apesar de seu papel limitado na formação de cristais, a amilose pode influenciar a organização das duplas hélices, interferindo na densidade de empacotamento das cadeias de amilopectina (Oliveira, 2011).

Os grânulos de amido na forma nativa exibem a cruz de malta ao serem observados sob a luz polarizada, onde o centro da cruz corresponde ao hilum (Figura 2.4). Este fenômeno, denominado como birrefringência, não implica necessariamente na forma cristalina, mas evidencia um alto grau de organização molecular nos grânulos (Beninca, 2008; Denardin e Silva, 2009).



Figura 2.4: Grânulos de amido nativos exibindo a cruz de malta (birrefringência) sob a luz polarizada. FONTE: Blaszczak *et al.* (2005) apud Beninca (2008).

Em água fria o amido é insolúvel, decantando na suspensão. Porém, quando o grânulo de amido é aquecido em excesso de água, as pontes de hidrogênio entre as cadeias de amilopectina e amilose vão se desfazendo em decorrência da vibração causada pela temperatura. Simultaneamente, as moléculas de água penetram na macromolécula e passam a se associar com os grupos hidroxila expostos, formando novas pontes de hidrogênio. Também, ocorre a lixiviação de grande parte da amilose para a fase aquosa, contribuindo na solubilização. A entrada da água faz com que o grânulo inche, e, o rompimento das pontes de hidrogênio originais desconstrói a estrutura cristalina. O grânulo de amido pode inchar até 30-100 vezes o seu volume original, dependendo de sua fonte botânica (Singh *et al.*, 2003; Oliveira, 2011).

O processo descrito implica na gelatinização do amido, que é definida como o colapso da ordem cristalina, manifestando mudanças irreversíveis, tais como o inchamento, aumento da viscosidade, perda de birrefringência óptica, desenrolamento e dissociação das duplas hélices e solubilidade. A gelatinização ocorre inicialmente na região amorfa do grânulo (hilo) e segue rapidamente para a periferia (Singh *et al.*, 2003). A Figura 2.5 apresenta imagens do processo de gelatinização do grânulo de milho.

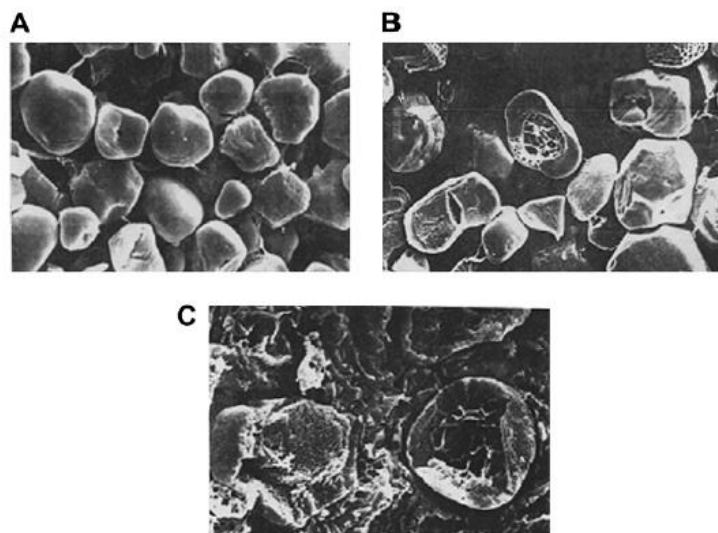


Figura 2.5: Imagens do amido de milho em processo de gelatinização. As temperaturas nas imagens foram (A) 40°C (60 min.), (B) 60°C (20 min.) e (C) 70°C (5 min.). A temperatura de gelatinização era 71°C.

FONTE: Zhongdong *et al.* (2003) apud Peng *et al.* (2007).

2.2 Produção de etanol a partir do amido

A questão fundamental da utilização do amido como substrato para a *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo responsável pela fermentação alcoólica, é que esta levedura metaboliza apenas monossacarídeos a trissacarídeos (dependendo da cepa). Contudo, conforme apresentado na Figura 2.6, o amido é fonte de açúcares fermentescíveis apenas quando se efetua o rompimento das ligações glicosídicas (hidrólise), liberando de glicose a trissacarídeos. Convém ressaltar que, com o uso de ferramentas da biologia molecular, é possível a construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de degradar o amido através da introdução de genes específicos, mas a utilização destas cepas em particular não compõe o escopo do presente estudo (Cinelli, 2012).

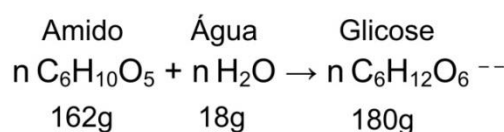
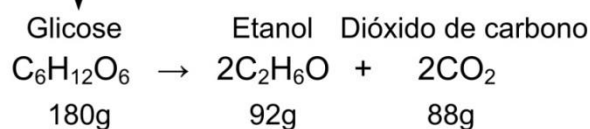
Hidrólise**Fermentação**

Figura 2.6: Reações e estequiometria do processo de hidrólise do amido e fermentação.

A degradação do amido pode ser realizada através da hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida possui certas desvantagens, como: problemas de corrosão dos equipamentos; operação em temperaturas e pressões mais elevadas; certa destruição dos açúcares e necessidade de posterior neutralização, produzindo uma quantidade significativa de sal que pode ser prejudicial à levedura (Cereda, 2003; Machado e Abreu, 2006). Sobre a hidrólise enzimática, esta já é uma técnica consolidada nos EUA, China e Tailândia, sendo o etanol produzido a partir do milho nos EUA e na China, e a partir da mandioca na China e Tailândia (Gupta and Verma, 2015).

Quimicamente, as enzimas pertencem a uma classe específica das proteínas. Funcionalmente, as enzimas são biocatalisadores e, como tais, possuem desempenho influenciado por temperatura, pH e concentração do substrato.

As enzimas podem ser extraídas de diferentes fontes biológicas: plantas, animais e microrganismos. Contudo, as amilases comerciais são principalmente produzidas por fungos e bactérias.

De acordo com a forma de atuação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em dois grupos, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 no interior do amido de forma randômica, gerando oligossacarídeos lineares e ramificados. Dentre estas, a mais conhecida é a α -amilase. Já as exoamilases, hidrolisam as extremidades das cadeias de amilose e amilopectina agindo tanto sobre as ligações α -1,4 quanto sobre as α -1,6. A exoamilase comumente empregada na produção de etanol é a glucoamilase. Para uma hidrólise mais eficiente, as endoamilases e exoamilases são empregadas em conjunto por atuarem sinergicamente. A α -amilase degrada o amido em cadeias maiores, enquanto que a glucoamilase é responsável pela liberação das moléculas individuais de glicose (Cinelli, 2012).

Usualmente a α -amilase e a glucoamilase são adicionadas em etapas distintas, em razão de possuírem diferentes pH e temperaturas ótimos de operação. Primeiramente a α -amilase é adicionada, na etapa definida como liquefação. Após a liquefação, o pH e a temperatura são ajustados para o favorecimento da glucoamilase que é então adicionada, sendo esta etapa chamada de sacarificação.

As enzimas comerciais são produzidas por empresas como DuPont (Genencor), Novozymes, Prozyn e DSM. Apesar das tentativas de padronização internacional, cada produtor declara a sua maneira a atividade enzimática das preparações que o mesmo comercializa. As unidades são expressas em condições diferentes de ensaio, dificultando a comparação de atividades a partir das fichas técnicas dos produtos (Cereda, 2003).

Entre os microrganismos utilizados se tem, por exemplo (Cereda, 2003; Genencor, 2009b):

- Liquefação: *Bacillus licheniformes*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus acidopullulyticus*; *Aspergillus kawachi*;
- Sacarificação: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*.

Em média, as enzimas de liquefação possuem pH e temperatura ótimos entre 5 – 7 e 80 – 95°C, respectivamente. O emprego de temperaturas no entorno de 90°C não apenas favorece a ação da α -amilase, mas também promove a gelatinização do amido, que nesta condição tem sua susceptibilidade ao ataque enzimático aumentada significativamente. Sobre as enzimas de sacarificação, estas possuem valores ótimos de pH entre 4 – 4,5 e temperatura no entorno de 65°C (Cereda, 2003; Masiero, 2012; Vohra *et al.*, 2014). Contudo, nos intervalos mencionados há uma variação razoável, pois as empresas produtoras estão continuamente lançando novas enzimas, principalmente em decorrência de aperfeiçoamentos por manipulação genética das cepas. Entre os objetivos no melhoramento, cita-se: economia energética, pela redução da temperatura ótima; economia na dosagem, pelo aumento da atividade da enzima e; robustez da enzima, com atividade pouco influenciada em determinadas mudanças de temperatura e pH.

Um método que tem se destacado e ganho cada vez mais adeptos é a Sacarificação Simultânea com a Fermentação (SSF). Onde, após a liquefação, a glucoamilase e a levedura são adicionadas em etapa única. Os pHs ótimos estão no mesmo intervalo (4 – 4,5), mas as temperaturas não, sendo para a levedura entre 30 – 35°C e para a glucoamilase cerca de 65°C. O processo de SSF é conduzido na temperatura da levedura. Embora não estando em sua temperatura ótima, a glucoamilase possui tempo suficiente para realizar sua catálise, pois usualmente a fermentação leva de 24 a 48 h. Na verdade, a atuação lenta da glucoamilase consiste em uma das vantagens argumentadas em favor da SSF. Pois, a atuação acelerada levaria a uma elevada concentração de glicose no meio, que por sua vez não é benéfico para levedura devido ao efeito da pressão osmótica. O mais adequado é que a glicose seja liberada na medida com que a levedura consegue metabolizá-la. Outras questões pontuadas a favor da SSF são (Alfani *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2012; Vohra *et al.*, 2014):

- A atividade da enzima não é inibida pelo produto, pois a glicose é continuamente removida do meio pelo consumo da levedura;
- O risco de contaminação é reduzido. Quando a sacarificação é realizada separadamente, entre as etapas de sacarificação e fermentação outros microrganismos podem contaminar o meio, consumindo a glicose que seria convertida em etanol. Na SSF, a presença desde o início da *Saccharomyces cerevisiae* inibe a contaminação por outros microrganismos, através da competição microbiológica;

- Economia energética, por não realizar a sacarificação em temperaturas no entorno de 65°C e;
- Simplificação do processo e economia de tempo, por realizar duas etapas em uma.

Também existe um processo alternativo, denominado pelas seguintes formas: hidrólise a frio, não convencional, de amido granular ou não cozido. Por não se trabalhar em temperaturas no entorno de 90°C, a liquefação já não ocorre mais separadamente, de maneira que a hidrólise por completa ocorre simultaneamente com a fermentação. Sendo o amido na forma granular, as temperaturas de processo ficam abaixo das de gelatinização, podendo ocorrer um pré-tratamento entre 40 – 60°C para promover certo inchamento do grânulo e certa atividade enzimática (se as enzimas já estiverem presentes) (Masiero, 2012).

Visando atender às características do método de hidrólise a frio, estudos têm sido realizados no sentido de propor α -amilases com temperatura ótima mais baixa e pH ótimo mais próximo do da levedura, a exemplo, tem-se a α -amilase GC 626 da Genencor, produzida a partir de cepa de *Aspergillus kawachi*, esta enzima possui pH ótimo entre 3,5 – 4 e temperatura ótima em torno de 65°C (Genencor, 2009a).

O principal argumento em favor da hidrólise a frio é a economia energética. Porém, existem certas desvantagens, como a necessidade geral de doses mais elevadas de enzimas e tempos mais prolongados de fermentação (Masiero, 2012), já que na forma granular o denso empacotamento das cadeias promove maior resistência ao acesso enzimático. Enquanto que, como foi visto na seção 2.1, no amido gelatinizado as cadeias estão mais abertas e expostas ao ataque enzimático.

2.3 Componentes da parede celular e influência no processo

Quando o mosto para a produção de etanol é preparado, além do composto de interesse que é o amido, outros constituintes da matéria-prima também acabam integrando o meio.

Como todo ser vivo, a matéria-prima amilácea é formada por células, e são os componentes da parede celular os maiores responsáveis pela viscosidade final do mosto fermentado. As paredes de células vegetais são formadas por polissacarídeos complexos com funções estruturais e fisiológicas, tais polissacarídeos são: celulose, hemicelulose e substâncias pécticas. Estruturalmente, a celulose e hemicelulose formam uma rede embebida em uma matriz de substâncias pécticas, como pode ser visto na Figura 2.7 (Correia, 2010).

A parede celular é dividida em três regiões distintas: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é a região que une as paredes primárias de células vizinhas, essa camada intercelular é rica em substâncias pécticas mergulhadas em um meio aquoso. A parede secundária, sendo caracterizada pela presença de lignina, se desenvolve em tecidos mais rígidos e não suculentas. Portanto, não há a formação da parede secundária no caso da batata-doce, e por isto na Figura 2.7 não é apresentada tal parede (Correia, 2010).

Semelhantemente ao amido, os polissacarídeos da parede celular são capazes de reter água em seu interior, inchando e aumentando a viscosidade. No âmbito da nutrição, a celulose, hemicelulose e substâncias pécnicas pertencem à classe das fibras alimentares, onde a propriedade de retenção é desejável, pois também podem ser retidas moléculas prejudiciais à saúde se absorvidas. As capacidades de aumento de volume, formação de gel e aumento de viscosidade também são desejáveis no sentido nutricional, por resultarem em efeitos benéficos no trânsito intestinal (Chimoff e Simms, 2008).

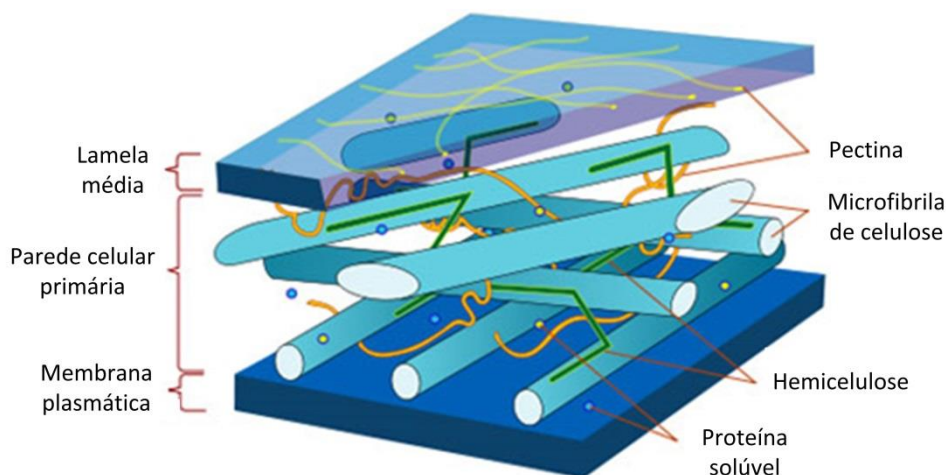


Figura 2.7: Estrutura da parede celular de vegetais.
FONTE: Adaptado de Sticklen (2008).

Entretanto, todas as características então descritas como positivas para a saúde humana ao mesmo tempo são negativas quando o objetivo é a produção de etanol. O aumento da viscosidade reduz a eficiência de fermentação e, na destilação, uma maior quantidade de etanol pode ficar retida na estrutura de tais macromoléculas. Para o contorno destes problemas têm sido empregadas enzimas desintegrantes, como celulases, hemicelulases e pectinases (Puligundla *et al.*, 2011).

A Figura 2.8 traz imagens de uma seção transversal de batata antes e depois de um pré-tratamento enzimático com celulases, hemicelulases e pectinases. Antes, pode-se observar que os grânulos de amido estão mais incorporados dentro da matriz da parede celular e, após, ficaram mais livres.

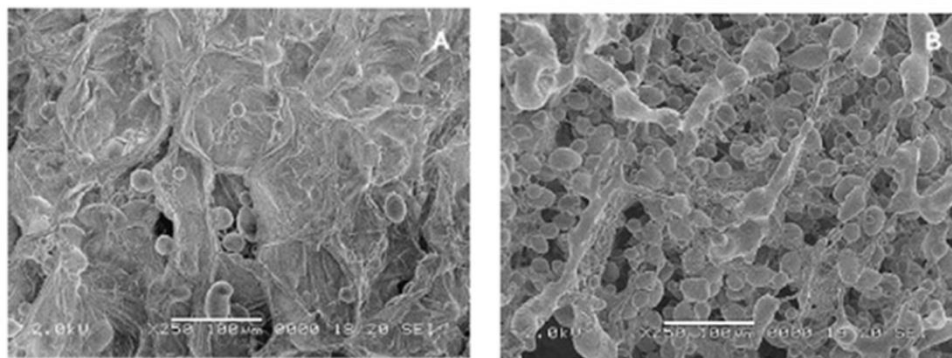


Figura 2.8: Imagens de uma seção transversal de batata. (A) Antes e (B) depois de um pré-tratamento enzimático com celulases, hemicelulases e pectinases.
FONTE: Srichuwong *et al.* (2009).

As próximas subseções seguem a fim de apresentar um pouco mais sobre a estrutura química dos polissacarídeos da parede celular.

2.3.1 *Celulose*

A celulose é o polímero mais abundante da natureza, formado por unidades de glicose unidas por ligações β -1,4, insolúvel em água, produzido na forma de microfibrilas e de estrutura semicristalina. As cadeias são dispostas linearmente e unidas por pontes de hidrogênio. A celulose promove suporte e resistência à parede celular (Chimoff e Simms, 2008; Correia, 2010).

2.3.2 *Hemicelulose*

A hemicelulose é um polímero de celulose, predominantemente insolúvel em água, no qual a maior parte dos resíduos de glicose contêm cadeias laterais compostas por outros carboidratos (Chimoff e Simms, 2008; Correia, 2010). Os principais monossacarídeos que compõem a hemicelulose, além da glicose, são: D-xilose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-manose e ácido D-glucorônico. A hemicelulose mais abundante na parede primária de dicotiledôneas, classe botânica na qual a batata-doce se enquadra, é a xiloglucana. As xiloglucanas são longas o suficiente para se estenderem entre a distância de duas microfibrilas de celulose, unindo-as e formando assim uma rede coesa celulose-hemicelulose (Correia, 2010).

2.3.3 *Substâncias Pécicas*

Substâncias pécicas são polissacarídeos complexos, altamente ramificados e geralmente hidrofílicos. A maior parte é encontrada na lamela média, onde são importantes para adesão célula-célula. Já as pectinas presentes na parede celular primária formam um gel hidratado que preenche o espaço entre as camadas fibrosas de celulose. Este gel constitui uma barreira que determina o tamanho das moléculas que podem atravessar a parede primária, passando apenas íons e moléculas pequenas como água e sacarose. As substâncias pécicas possuem valor comercial por sua capacidade de formação de gel, em alimentos, por exemplo, são utilizadas como espessantes, emulsificantes e conservantes (Chimoff e Simms, 2008; Correia, 2010).

A cadeia principal é constituída por resíduos de ácido galacturônico, unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por metanol e parcial ou completamente neutralizados por uma ou mais bases. Considerando as modificações da cadeia principal, as substâncias pécicas são classificadas em (Correia, 2010):

- Protopectinas: há uma elevada de formação de sais dos grupos carboxílico do ácido galacturônico com o cálcio. São insolúveis em água;
- Ácido pécico: existem poucos grupos formados pela esterificação com metanol, ocorrendo mais a presença de sais e ácido;

- Ácido pectínico: Semelhante ao ácido péctico, mas ocorrendo mais a presença de ácido;
- Pectina: em sua composição também são encontrados açúcares neutros, como L-ramnose, L-arabinose e D-galactose. As pectinas com mais da metade dos grupos carboxílicos esterificados com metanol têm poder de geleificação na presença de açúcares e ácidos. Já, quando menos da metade dos grupos estão esterificados, a geleificação ocorre na ausência de açúcares e na presença de alguns íons, principalmente o cálcio.

Apesar de nos conceitos aqui abordados as pectinas serem apresentadas como uma classe dentro das substâncias pécticas, é muito comum na literatura a utilização do termo “pectinas” para se referir às substâncias pécticas de maneira geral.

2.4 Fermentações com elevada densidade

Sendo a redução de custos um objetivo constante nos processos, uma medida que tem sido proposta para isto é a fermentação com elevada densidade. Neste método há uma elevada concentração de substrato no meio, resultando em elevadas concentrações de etanol, geralmente entre 15 – 17% (v/v), enquanto que a faixa de 10 – 12% (v/v) é observada na maioria das usinas no mundo. As vantagens do meio concentrado são: (i) redução no consumo de água para a diluição, e com isto uma menor produção de efluente (vinhaça); (ii) menor consumo energético, pois a quantidade de massa no processo é reduzida e; (iii) possibilidade de se trabalhar com equipamentos menores, ou, aumento da capacidade produtiva em uma planta já instalada, ou seja, com os equipamentos disponíveis é possível produzir mais (Puligundla *et al.*, 2011).

Apesar das vantagens apresentadas, também existem questões desfavoráveis associadas ao método com elevada densidade, como o aumento da pressão osmótica e a toxicidade do etanol sobre a levedura. Adicionalmente, o uso de matérias-primas amiláceas também possui a desvantagem do aumento da viscosidade do meio, especialmente no caso de fontes tuberosas, fazendo necessário o emprego de enzimas redutoras de viscosidade (Cao *et al.*, 2011; Puligundla *et al.*, 2011).

Com relação à pressão osmótica, a suplementação com nutrientes e a utilização de osmoprotetores são possibilidades para acelerar o desempenho da levedura. Além da suplementação com fontes de nitrogênio, o acréscimo de ergosterol (precursor da vitamina D2), ácido oleico, quitina, leite desnatado em pó e farinha de soja também já foram relatados por serem benéficos na fermentação com elevada densidade (Puligundla *et al.*, 2011).

Alguns suplementos também podem ter efeito osmoprotetor, Thomas, Hynes e Ingledew (1994) o identificaram em extrato de levedura, triptona e adenina-uracilo-citosina. Considerando a osmoproteção comprovada da prolina e glicina betaína em plantas e bactérias, os autores também realizaram experimentos com tais compostos a fim de verificar se exerciam o mesmo efeito sobre a *Saccharomyces cerevisiae*, a glicina também foi incluída no estudo, sendo uma precursora da glicina betaína. Os três compostos testados apresentaram a osmoproteção, e foi obtido o melhor resultado quando utilizados em conjunto, na análise individual a glicina se demonstrou mais eficaz.

No ensaio de controle apenas 43% do açúcar foi consumido, mas quando os três compostos estavam presentes o resultado subiu para 87%, e no caso com apenas glicina o consumo foi de 65%. Sobre a produção de etanol, com o controle o rendimento foi de $8,8\% \pm 0,3\%$ (v/v), enquanto que na presença dos três osmoprotetores o resultado foi $18,0\% \pm 0,6\%$ (v/v).

Apesar de até então ter-se enfatizado sobre o emprego de nutrientes e osmoprotetores, cabe recordar sobre o método de SSF (abordado na seção 2.2), que consiste em outra maneira de contornar o efeito osmótico.

Também, com técnicas genéticas e metabólicas tem sido possível fazer com que a levedura seja mais tolerante tanto ao efeito osmótico, quanto à inibição causada pelo etanol. Como exemplo, cita-se o estudo de Hou (2009), que obteve tal melhoria e uma leve resistência da levedura à temperatura através da técnica de embaralhamento de genoma. A tolerância aos fatores de estresse foi evidenciada pela imagem de cultivo em lâminas com diluições em série, o crescimento superior da levedura selecionada em relação ao controle pôde ser visto em três experimentos de cultivo: (i) meio padrão com 30% (m/v) de glicose, a 30°C; (ii) meio padrão com 15% (v/v) de etanol, a 30°C e; (iii) meio padrão a 42°C.

Mussatto *et al.* (2010) fez uma revisão interessante sobre demais técnicas de aprimoramento da levedura, e também as apresentou em uma imagem simplificativa (Figura 2.9).

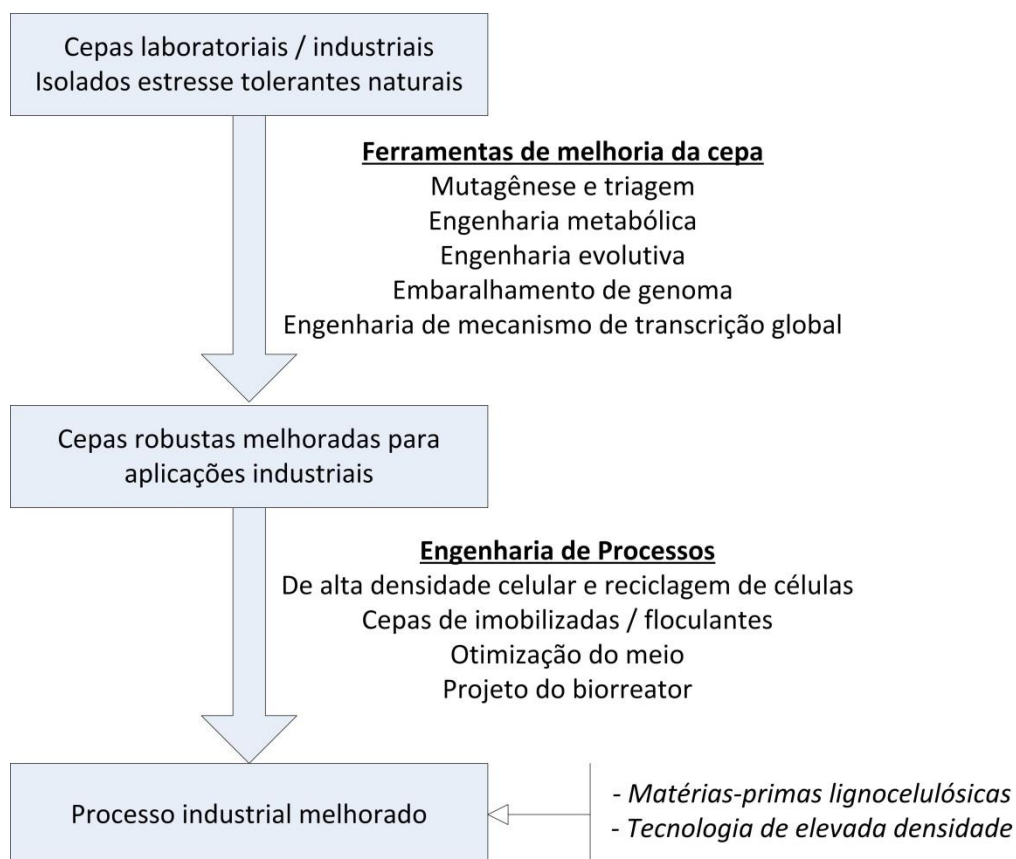


Figura 2.9: Integração entre a melhoria da levedura e aplicação nos processos de produção de etanol.

FONTE: Adaptado de Mussatto *et al.* (2010).

Outro método a mencionar consiste no esgotamento (*stripping*), que tem sido proposto para a redução do efeito tóxico do etanol sobre a levedura, neste método o etanol é removido do meio pela passagem de uma corrente de gás. A introdução do gás pode ser no próprio biorreator ou em uma coluna de esgotamento, onde a corrente de vinho após a extração retorna para o biorreator.

Segundo Aiba *et al.* (1968) apud Sonogo *et al.* (2014), o acúmulo de etanol em concentrações superiores a 40 g/L diminuiu significativamente a taxa de crescimento celular, implicando em uma redução na produtividade de etanol. Com isto, Sonogo *et al.* (2014) realizaram experimentos de esgotamento, sendo a fermentação realizada em meio sintético de sacarose e nutrientes, e a injeção de CO₂ foi direto no biorreator. A introdução do gás foi iniciada em diferentes concentrações de etanol, e o melhor resultado obtido foi quando a injeção de CO₂ se iniciou na concentração de 43,3 g/L de etanol, onde a produtividade resultante foi 11,4 g/L.h, enquanto que no processo convencional a produtividade foi 9,1 g/L.h, ou seja, com o esgotamento a produtividade foi 25% superior. No final do processo a concentração de etanol estimada no meio foi próxima nos dois casos, 82,1 g/L para o processo convencional e 82,5 g/L para o processo com esgotamento. A vantagem do esgotamento foi o aumento da produtividade, e assim a redução do tempo de fermentação. No processo convencional a concentração de etanol aumentou até 9 h de fermentação, enquanto que em todos os experimentos com esgotamento a concentração de etanol começou a diminuir após 7 h.

Já é comprovado o fato que o esgotamento é um método para reduzir a inibição causada pelo etanol, o que se tem estudado na literatura são meios de como aperfeiçoá-lo. Como, por exemplo, Taylor *et al.* (2010) estudaram a possibilidade de substituir o CO₂ por outro gás inerte, e verificaram que até 90% em volume de CO₂ poderia ser substituído por ar ou nitrogênio sem afetar significativamente o desempenho do sistema. Os autores realizaram experimentos em uma planta piloto, de processo contínuo, tendo como alimentação farinha de milho e o mosto era de elevada concentração (~40% de sólidos secos). No processo de hidrólise a conversão foi de 95%, e o rendimento em etanol foi 88% do máximo teórico.

2.5 Processos produtivos

Apesar de existirem propostas de produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas amiláceas, hoje no nível de implementação industrial o que predomina é o processo a partir do milho, onde existem dois métodos: moagem úmida e moagem a seco.

A maioria do etanol americano é produzida pelo método de moagem a seco, que geralmente é empregado em plantas de menor capacidade e o foco consiste na produção de etanol. Na moagem a seco não há um fracionamento prévio do grão, o que, por outro lado, ocorre nos processos de moagem úmida, dando origem a diferentes coprodutos de elevado valor agregado, e por esta razão as usinas de moagem úmida também são chamadas de biorrefinarias de milho (Walker, 2011; Vohra *et al.*, 2014).

Na Figura 2.10 podem ser vistos os métodos de moagem seca e úmida, conforme apresentado em Vohra *et al.* (2014). Pode-se observar a formação de diferentes coprodutos alimentícios, e os resíduos DDG/DDGS e licor também são empregados na

alimentação animal. Na Figura 2.10, no método de moagem úmida o enfoque é dado às operações que antecedem a produção de etanol, pois na sequência o processo é análogo ao que foi apresentado para a moagem seca (hidrólise – fermentação – destilação).

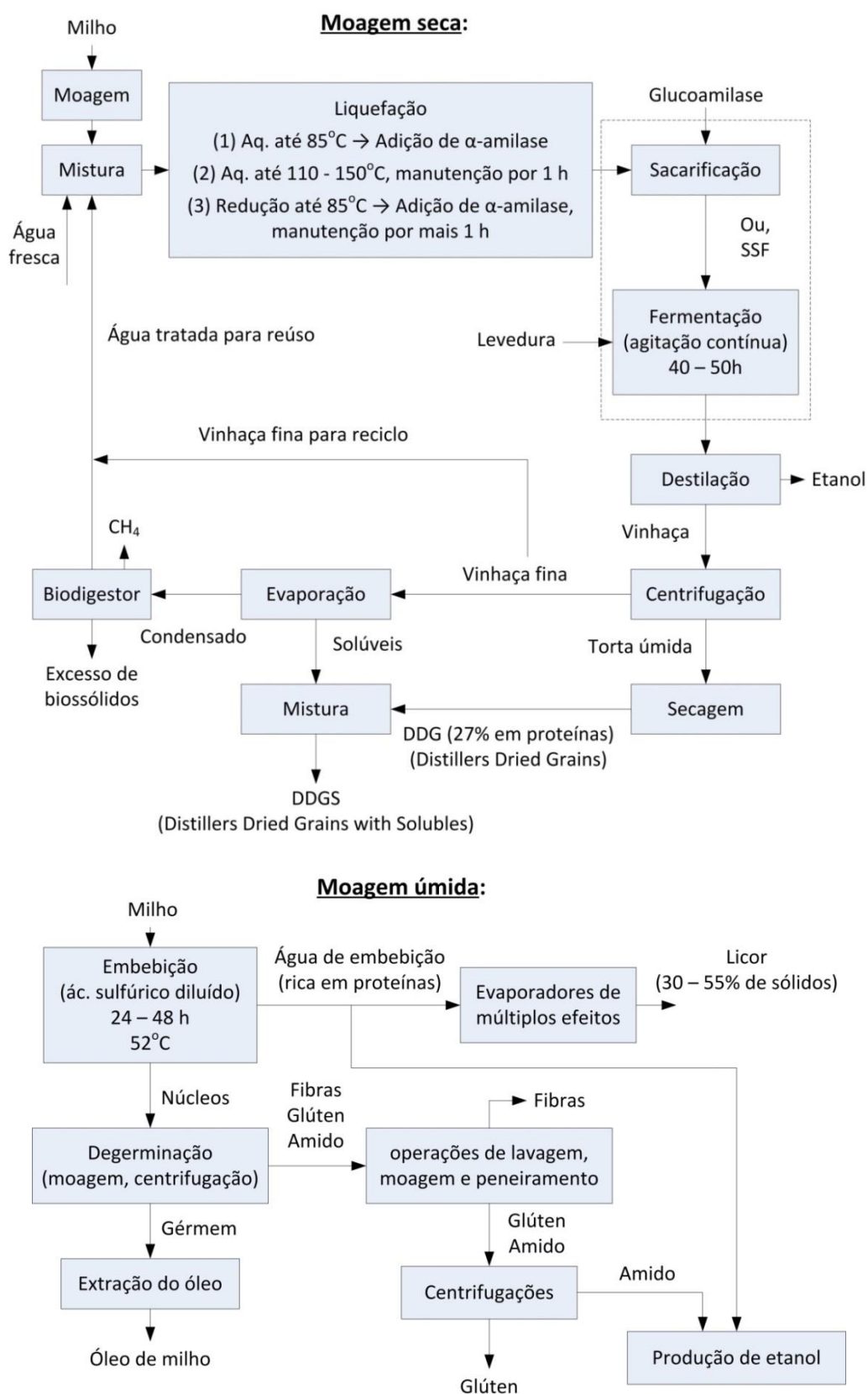


Figura 2.10: Processos de produção de etanol a partir do milho.
 FONTE: Adaptado de Vohra *et al.* (2014).

No método de moagem úmida, é interessante comentar sobre a mistura da água de embebição para a produção de etanol, na verdade a mistura ocorre mais especificamente na etapa de sacarificação ou SSF, onde as vantagens da mistura são: (i) por possuir pH mais baixo, a água de embebição contribui no ajuste do pH (de aproximadamente 6 da liquefação para em torno de 4,5) e; (ii) nutrientes são acrescentados para a fermentação. Outro ponto a comentar sobre o método de moagem úmida é que a fermentação pode levar de 20 – 60 h, dependendo da quantidade de carboidrato disponível. Também, como neste sistema há a remoção prévia de demais constituintes, permanecendo praticamente o amido, existem poucos sólidos insolúveis no final da fermentação, o que facilita a reciclagem da levedura (Vohra *et al.*, 2014).

Em Puligundla *et al.* (2011) há um fluxograma um pouco diferente do que é apresentado na Figura 2.10, os autores exemplificaram a produção com elevada densidade considerando diferentes matérias-primas amiláceas, como pode ser visto na Figura 2.11.

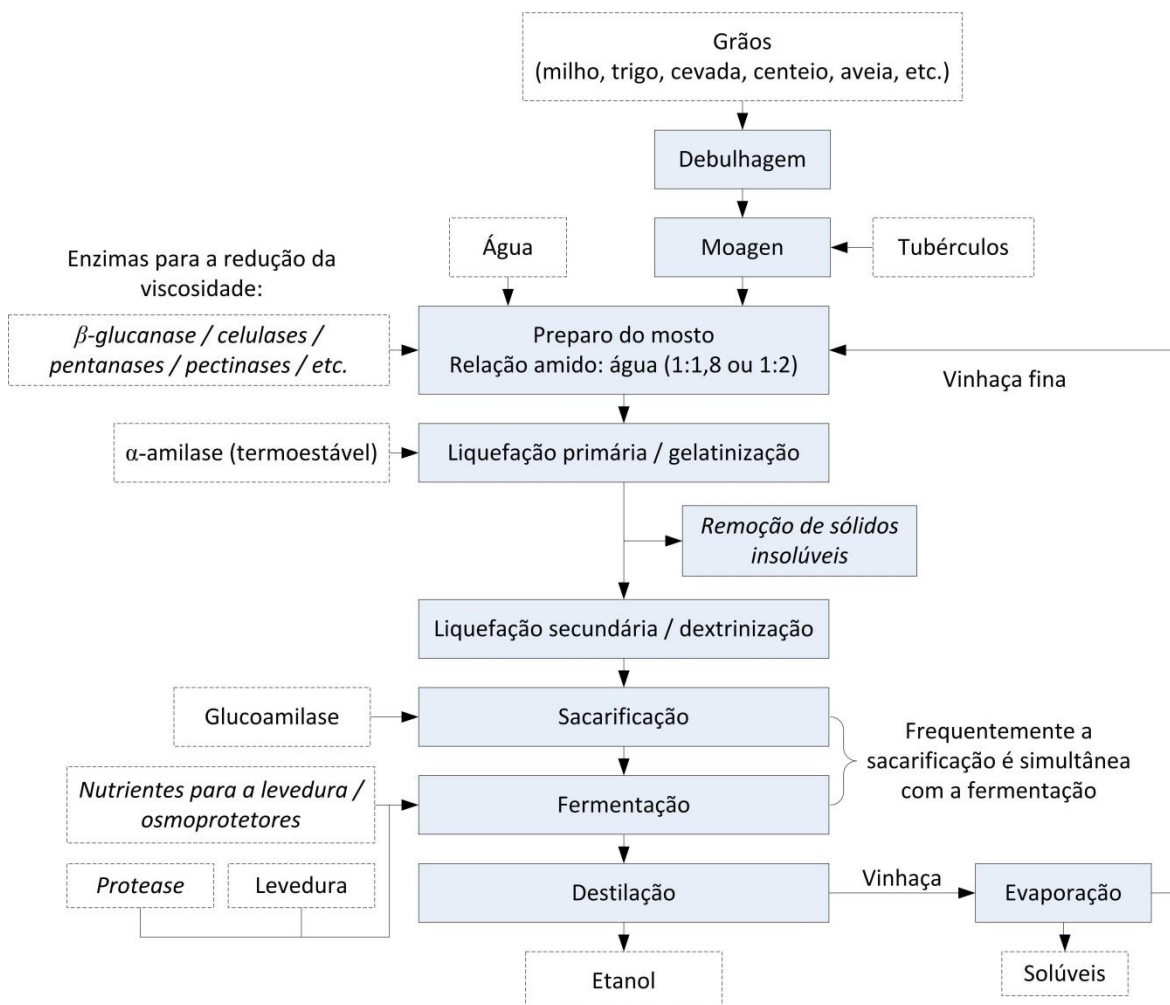


Figura 2.11: Produção de etanol com elevada densidade (processo de moagem seca). São consideradas algumas práticas/entradas adicionais em *itálico*, as quais possuem importância por aumentar a eficiência do processo.

FONTE: Adaptado de Puligundla *et al.* (2011).

2.5.1 Estudos com batata-doce

Na literatura são encontrados alguns trabalhos sobre a produção de etanol a partir de batata-doce, basicamente na escala laboratorial. Contudo, Zhang *et al.* (2011) obtiveram resultados de uma planta piloto e industrial, que são abordados em mais detalhes no final desta seção, onde são apresentados os estudos com elevada densidade.

Dewan *et al.* (2013) realizaram um estudo prévio, comparando isoladamente o desempenho de uma α -amilase a 85°C com o de uma glucoamilase a 55°C. Como foi obtida uma maior concentração de glicose com a glucoamilase, os autores selecionaram apenas esta enzima para a hidrólise. Entretanto, a hidrólise foi realizada em 72 h, em seguida foi conduzida a fermentação por 18 h utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis*, ao final a concentração de etanol foi de 49,07 g/L (ou 6,2% v/v) com um rendimento de 87,2% do máximo teórico.

Duvernay *et al.* (2013) realizaram experimentos para selecionar condições de hidrólise, ficou definida a liquefação a 85°C por 2 h, e a sacarificação a 65°C por 48 h. Após isto foi realizada a fermentação, também com o estudo da influência da suplementação. Os autores testaram farinha de batata e batata fresca, nas respectivas concentrações de matéria seca: 25% e 12,5% (m/v). Para a batata fresca a concentração foi a metade da de farinha, pois os autores acreditaram que assim se teria um melhor acesso ao substrato, e também se estaria reduzindo o problema da viscosidade. Em 48 h de fermentação as concentrações de etanol resultaram em 62,6 g/L (ou 7,93% v/v) para a farinha e 33,6 g/L para a batata fresca (ou 4,26% v/v). Nos estudos comparativos, com e sem suplementação, não foi identificada diferença significativa.

Lareo *et al.* (2013) investigaram sobre a necessidade da gelatinização antecedente à liquefação, os experimentos foram sem gelatinização e com gelatinização a 90, 100 e 121°C, os resultados demonstraram que a gelatinização poderia ser dispensada. A liquefação foi a 86°C durante 1,5 h.

Nos experimentos de SSF, Lareo *et al.* (2013) testaram mostos com batata fresca e com farinha. Considerando as concentrações de substrato dadas em matéria seca (m:v), para a batata fresca nas concentrações de 1:2,2 e 1:5 foram obtidos os respectivos teores de etanol 12,67% v/v (48 h) e 7,98% v/v (27 h), o primeiro caso foi sem o acréscimo da água de diluição, ou seja, na proporção 1:2,2 consta apenas a umidade da batata. Para a farinha nas concentrações de 1:3 e 1:5 foram obtidos os respectivos teores de etanol 12,29% v/v (48 h) e 8,62% v/v (18 h). Os autores não utilizaram qualquer enzima para reduzir a viscosidade do meio, e não relatam se houve alguma dificuldade referente à viscosidade no experimento em que não utilizaram água de diluição (concentração 1:2,2). Contudo, presume-se que tal dificuldade ocorreu, tanto que para tal situação a conversão dos açúcares foi de 67%, enquanto no caso em que utilizaram a farinha na concentração de 1:3 a conversão dos açúcares foi de 100%, até por esta razão os teores de etanol destes dois casos ficaram próximos (~12,5%).

Em mostos de farinha de batata-doce, Diaz *et al.* (2014) realizaram experimentos comparando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (a 35°C) com a termotolerante *Kluyveromyces marxianus* (a 35 e 40°C). Também, foi investigada a extração de antocianinas durante o processo de SSF na batata-doce de polpa roxa. Esta batata contém uma elevada quantidade de antocianinas, que são antioxidantes benéficos à saúde e extraíveis com diferentes solventes, e entre eles o etanol. Na análise geral, a

Saccharomyces cerevisiae se demonstrou mais interessante, com um processo mais rápido ao atingir o máximo de etanol e com uma maior extração de antocianinas. Tanto para a *Saccharomyces cerevisiae* quanto para *Kluyveromyces marxianus* os melhores resultados foram obtidos a 35°C e pH 4,5. Considerando a obtenção dos valores máximos, com a *Saccharomyces cerevisiae* foram atingidos 9,77% v/v de etanol (24 h) e de antocianinas 22,1 mg/100g de batata (24 h), e com a levedura *Kluyveromyces marxianus* foram atingidos 10,57% v/v de etanol (72 h) e de antocianinas 15,6 mg/100g de batata (24 h).

Sobre os estudos com elevada densidade e envolvendo processos de redução de viscosidade, parece que as pectinas são as maiores responsáveis pela viscosidade final, com base nos estudos de Srichuwong *et al.* (2009). Segundo Sørensen *et al.* (2000) apud Srichuwong *et al.* (2009), as paredes celulares de plantas dicotiledóneas são compostas por 30 – 50% de pectina. Recordando ainda, que entre os componentes da parede celular apenas as substâncias pécticas possuem larga aplicação na indústria de alimentos como agentes para a formação de gel (Quiroga, 2013). Contudo, Cao *et al.* e Zhang *et al.* (2011) relataram resultados positivos utilizando outras enzimas que não pectinases, o primeiro utilizou uma celulase e o segundo uma xilanase (atuante sobre a hemicelulose).

Srichuwong *et al.* (2009) iniciaram seu estudo investigando as condições de pré-tratamento do mosto para a redução da viscosidade, e testaram as seguintes enzimas comerciais: Celluclast 1.5L, Pectinex Ultra SP-L e Viscozyme L. Conforme Anthon e Barrett (2008) apud Srichuwong *et al.* (2009), a Viscozyme L contém múltiplas enzimas degradantes de substâncias pécticas, além de arabinase, celulase, hemicelulase e xilanase. Correia (2010) analisou a atividade enzimática da Viscozyme L e dentre os diferentes substratos considerados, 90% da atividade correspondeu sobre substâncias pécticas. A Figura 2.12 traz os resultados de Srichuwong *et al.* (2009). Após este primeiro estudo, Srichuwong *et al.* (2009) definiram que a etapa de pré-tratamento seria a 50°C por 3 horas e com as três enzimas comerciais. No processo de SSF, a estabilização da fermentação foi observada em 48 h, com a produção de etanol de 16,52% v/v, mas em 24 h o teor já era significativamente elevado, analisando o gráfico apresentado pelos autores se estima entre 14,5 – 15 % v/v.

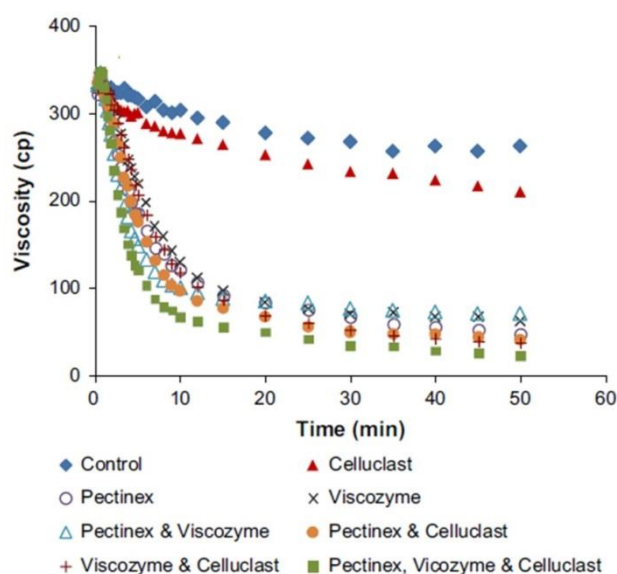


Figura 2.12: Resultado do estudo de pré-tratamento para a redução de viscosidade, testes com diferentes enzimas comerciais. FONTE: Srichuwong *et al.* (2009).

Cao *et al.* (2011) estudaram o emprego de uma celulase no tratamento prévio de um mosto formado com farinha de batata-doce, os autores verificaram que 1 h de processo era suficiente, pois após este tempo não foi observada redução significativa na viscosidade. Nesta condição a viscosidade do meio reduziu de 3940 para 743,7 mPa.s (ou cP). No experimento comparativo de SSF de meios com e sem o tratamento a celulase, os teores de etanol obtidos foram respectivamente 15,5 e 14,8% v/v em 45 h.

Zhang *et al.* (2011) realizaram experimentos tanto em uma planta piloto como em uma planta industrial com capacidade de 10.000 ton/ano de etanol. Para a redução da viscosidade os autores utilizaram uma xilanase, que foi adicionada para atuar simultaneamente no processo de SSF, um resumo dos resultados encontrados pelos autores pode ser visto na Tabela 2.1. É interessante que existem diferenças significativas entre os valores de viscosidade entre a planta piloto e industrial, principalmente nos valores iniciais, mas os autores não comentam sobre esta questão.

Tabela 2.1: Resultados experimentais de uma planta piloto e industrial com emprego de uma xilanase para a redução da viscosidade.

	Planta piloto		Planta industrial	
Açúcares redutores totais (inicial em g/L)	200	240	205	215
Açúcares redutores totais (final em g/L)	16,76	18,13	15,71	18,24
Etanol (% v/v)	11,23	13,67	11,73	12,27
Tempo (h)	18	26	27	29
Viscosidade inicial (cP)	3492,1	6811,7	31154	33164
Viscosidade após 90 min. (cP)	745,6	912,4	473	340

FONTE: Zhang *et al.* (2011).

Huang *et al.* (2014) realizaram um trabalho interessante, isolaram micorganismos da batata-doce em estágio de putrefação, pressupondo que a partir deles se poderia produzir enzimas degradantes da parede celular. Em ensaios de cultivo, os autores selecionaram e identificaram o micorganismo associado ao resultado de maior redução de viscosidade, que foi o *Penicillium ochrochloron* Biourge. Em 16 testes diferentes foram identificados 13 tipos de atividade enzimática, tendo enzimas degrantes de substâncias pécicas, celulose e hemicelulose. Contudo, pela caracterização, o extrato atua preponderantemente sobre celulose e hemicelulose. Após isto os autores fizeram mais alguns experimentos a fim de aperfeiçoar a produção enzimática do *P. ochrochloron* Biourge, e por fim realizaram experimentos de SSF. Três experimentos de SSF foram realizados, o controle (sem enzima para a redução de viscosidade), com o extrato do *P. ochrochloron* Biourge e com uma celulase comercial. As enzimas para a redução de viscosidade foram adicionadas para atuar em conjunto com a glucoamilase e a levedura, uma simplificação dos resultados experimentais pode ser vista na Tabela 2.2. Nestes experimentos os meios partiram da mesma concentração de açúcares totais (179,6 g/kg) e de viscosidade (46.211 mPa.s).

Tabela 2.2: Resultados experimentais do estudo onde se produziu enzimas desintegrantes dos componentes da parede celular a partir de *P. ochrochloron* Biourge.

	Controle	Extrato	Celulase
Etanol (g/kg)	76,63	84,96	80,83
Eficiência de fermentação (%)	83,50	92,58	88,06
Tempo (h)	24	18	21
Viscosidade final (mPa.s)	15.986	1517	804

FONTE: Huang *et al.* (2014).

Concluindo, nesta seção diferentes metodologias desenvolvidas na literatura foram abordadas, merecendo destaque os processos com elevada densidade realizados com SSF, onde foram obtidos teores de etanol entre 13 – 16 % v/v em tempos entre 26 – 48 h. Para isto, foi necessário o emprego de pelo menos um tipo de enzima para a redução da viscosidade.

2.6 Referências

ALFANI, F. *et al.* Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 184-192, 2000/10/01 2000. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000054> >.

BENINCA, C. **Emprego de Técnicas Termoanalíticas na Análise de amidos Nativos e Quimicamente Modificados de Diferentes Fontes Botânicas**. Ponta Grossa: Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa 2008.

CAO, Y. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato powder for the production of ethanol under conditions of very high gravity. **Front Chem Sci Eng**, v. 5, n. 3, p. 318-324, 2011.

CEREDA, M. P. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. Fundação Cargill, 2003. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=XoH4ZwEACAAJ> >.

CHIMOFF, H.; SIMMS, J. Dossiê: Fibras Alimentares. **Food Ingredients Brasil**, 2008.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea às hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. Rio de Janeiro: Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) 2012.

CORREIA, A. A. D. S. **Maceração enzimática da polpa de noni**. Fortaleza: Dissertação de mestrado em ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Ceará 2010.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. D. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**. Santa Maria. 39: 945 - 954 p. 2009.

DEWAN, A. *et al.* Saccharification and Fermentation of Waste Sweet Potato for Bioethanol Production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 6, p. 739-747, 2013. ISSN 1745-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12042> >.

DIAZ, J. T.; CHINN, M. S.; TRUONG, V.-D. Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweetpotatoes for ethanol production and anthocyanins extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 53-60, 12// 2014. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014004658> >.

DUVERNAY, W. H.; CHINN, M. S.; YENCHO, G. C. Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 527-537, 2013. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84864027082&partnerID=40&md5=e7887f7508c4a049a0e95216f3caa3f2> >.

GENENCOR. **GC 626 Acid Alpha Amylase**: Danisco US Inc. 2009a.

_____. **STARGEN™ 002. Granular Starch Hydrolyzing Enzyme for Ethanol Production**. Danisco US Inc. 2009b.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, n. 0, p. 550-567, 1// 2015. ISSN 1364-0321. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114007084> >.

HOU, L. Improved Production of Ethanol by Novel Genome Shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1084-1093, 2009// 2009. ISSN 1559-0291. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-009-8552-9> >.

HUANG, Y. *et al.* The use of plant cell wall-degrading enzymes from newly isolated *Penicillium ochrochloron* Biourge for viscosity reduction in ethanol production with fresh sweet potato tubers as feedstock. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 480-491, 2014. ISSN 1470-8744. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1190> >.

LAREO, C. *et al.* Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 493, 2013. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.springerplus.com/content/2/1/493> >.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas: 579-588 p. 2007.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. E. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Revista de Política Agrícola**. 64-78 p. 2006.

MARTÍN, J. C.; LÓPEZ, E. Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa. **Revista colombiana de química**. 38(3): 395-408 p. 2009.

MASIERO, S. S. **Microusinas de etanol de batata-doce: viabilidade econômica e técnica**: Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 2012.

MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**: Tese de Doutorado em engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 2009.

MUSSATTO, S. I. *et al.* Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 11// 2010. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000947> >.

OLIVEIRA, D. C. D. **Caracterização e Potencial Tecnológico de Amidos de Diferentes Cultivares de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**: Dissertação de mestrado em engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) 2011.

PENG, L.; ZHONGDONG, L.; KENNEDY, J. F. The study of starch nano-unit chains in the gelatinization process. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 2, p. 360-366, 2007. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33847316867&partnerID=40&md5=c297bbefdc4084ac7b8f4c2c83411563> >.

PULIGUNDLA, P. *et al.* Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80052475026&partnerID=40&md5=923b7b7ea611c97112d796407a11bef9> >.

QUIROGA, A. L. B. Dossiê: Geleificantes. **Food Ingredients Brasil**. 2013.

RSC. Royal Society of Chemistry. Carbohydrates. 2014. Disponível em: < <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm> >. Acesso em: 05 jan 2014.

SHEN, Y. *et al.* Effects of Glucose Releasing Rate on Cell Growth and Performance of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) in Sweet Potato Medium for Fuel Ethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 10, 2012.

SINGH, N. *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 5// 2003. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814602004168> >.

SONEGO, J. L. S. *et al.* Extractive batch fermentation with CO₂ stripping for ethanol production in a bubble column bioreactor: Experimental and modeling. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 12, p. 7552-7559, 2014. Disponível em: <

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84918827307&partnerID=40&md5=6b0f51f2385ce5c2aad02e1542683daa> >.

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

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 6, p. 433-443, 06//print 2008. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2336> >.

TAYLOR, F. *et al.* Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4403-4408, 6// 2010. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410001781> >.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, 1994. ISSN 0099-2240 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201511/> >.

VOHRA, M. *et al.* Bioethanol production: Feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 573-584, 3// 2014. ISSN 2213-3437. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343713002054> >.

WALKER, G. M. 125th Anniversary Review: Fuel Alcohol: Current Production and Future Challenges. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 1, p. 3-22, 2011. ISSN 2050-0416. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00438.x> >.

ZHANG, L. *et al.* Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4573-4579, 2011. ISSN 09608524 (ISSN). Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79551690009&partnerID=40&md5=1e8e3fa41ed909deb3a4c9add3e2a7d3> >.

PARTE I

Caracterização da matéria-prima

Capítulo 3 – A Simple equation for total reducing sugars estimation on sweet potato and ethanol yield potential

Abstract

Nowadays, where research on renewable energy has been quite important, sweet potato stands out as a potential feedstock for ethanol production. It has high starch content and shows favorable agronomic and energetic characteristics. This paper proposes a simple equation to estimate the Total Reducing Sugars (TRS) available in sweet potatoes based upon its moisture. The correlation was developed using data published by other authors. The TRS incorporates those from sugars and starch. Thus, having this relationship is possible to estimate the potential of ethanol yield of a given sweet potato mash. This potential increases with sweet potato concentration, showing a non-linear behavior with a maximum. It is interesting to know the maximum as a reference, because increasing the sweet potato concentration causes operational difficulties due to the high viscosity. But, some studies have reported good fermentative results when the mash viscosity was reduced with enzymatic treatment. Additionally, the ethanol potential is very sensitive to moisture, increasing linearly when moisture is decreasing. So, it is more desirable to work with sweet potatoes drier than increasing its concentration in the mash. The major contribution of this study is the identification of the relationship between moisture and TRS. So far, there have been no studies that have made this association. If someone wants greater precision than equation presented, can apply the central idea to construct new equations for more specific cases. The suggested method has the advantages that moisture measurement is simple, involves cheaper apparatus and does not generate chemical waste.

Keywords: Sweet potato, starch, total reducing sugars, ethanol.

3.1 Introduction

Nowadays, in the world energy scenario, biomass is highlighted as a renewable energy that could reduce the dependence of fossil resources. Numerous crops have been proposed or are being tested as commercial energy resources. In general, the characteristics of the ideal energy crop include high yield (production per hectare), low energy input, low production costs, low levels of contaminants and a low nutrient requirement (De Souza *et al.*, 2014).

Sweet potato presents a good number of agronomic advantages. Such as, growth in poor soils, it is drought resistant, has high multiplication rate, short grow cycle, low illness incidence and plagues, cover rapidly the soil and therefore protect it from the erosive rains and controls the weed problem (Lareo *et al.*, 2013).

The starch content in sweet potato roots is 20 - 30%, making it a promising feedstock for bioethanol production (Srichuwong *et al.*, 2012).

Masiero (2012), studying about ethanol production in Rio Grande do Sul state (Brazil), selected for her analysis the potential feedstocks: sugarcane, saccharine sorghum, cassava and sweet potato. To estimate the ethanol yields in L.ha⁻¹, Masiero (2012) researched about the productivity of these raw materials in t.ha⁻¹, considering the region under study. Then, assuming the productivities: sugarcane 50.2 t.ha⁻¹, saccharine sorghum 79.7 t.ha⁻¹, cassava 30 t.ha⁻¹ and sweet potato 40 t.ha⁻¹, Masiero (2012) estimated the following yields: sugarcane 3062 L.ha⁻¹, saccharine sorghum 3492 L.ha⁻¹, cassava 4938 L.ha⁻¹ and sweet potato 5548 L.ha⁻¹.

About Life Cycle Energy efficiency, sweet potato also has a favorable prospecting. Using the Data Envelopment Analysis (DEA) tool, Ren *et al.* (2014) determined the life cycle energy efficiency of six ethanol production scenarios from four raw materials: sweet potato, wheat, corn and cassava. In these models, only the production from sweet potato and wheat was shown DEA efficient.

Although every sweet potato is rich of starch, there is a significant variation in the content between the different sweet potatoes. Therefore, to evaluate specifically the ethanol potential of a given sweet potato it is necessary to quantify the starch content. Conventional methods involve a reasonable number of steps and the use of expensive equipment and reagents. In general, starch is hydrolyzed and the produced glucose is quantified. The starch content is calculated by multiplying the stoichiometric factor of 0.9 (Figueiredo, 2008).

Concerning hydrolysis, it can be done by heating in an acid medium (HCl, as in De Carvalho *et al.* (2006); Figueiredo (2008); Zhang *et al.* (2011)), or by enzymatic process. Under acidic conditions, hexoses can be degraded to 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), that can even be produced at low temperatures, and gradually increases its concentration as the temperature rises (Zhao *et al.*, 2014). This degradation may be disadvantageous for acid hydrolysis as a method for the starch quantification, due to the underdetection of total glucose. Most starch analyzes are made enzymatically, taking advantage of the specificity to degrade only starch, and no other carbohydrates containing glucose (De Carvalho, Fernandes e Pires, 2006; McCleary *et al.*, 2006).

McCleary *et al.* (2006) report three different enzymatic methods, where two of them are recommended for starches with high amylose content. Amylose has the particularity that, after the gelatinization, crystallization occurs (retrogradation phenomena), forming regions more inaccessible to hydrolysis. In these cases, is needed a pretreatment with DMSO or KOH, aiming to break the hydrogen bonds between amylose molecules, noting that in the official method of AOAC the reagent employed is DMSO (McCleary *et al.*, 2006; Aoac, 2016).

Glucose measurement can be made by HPLC (Sluiter e Sluiter, 2005), titration using Fehling solution (De Carvalho, Fernandes e Pires, 2006; Figueiredo, 2008) or by spectrophotometry, where the color is produced with reagents such as DNS (Miller, 1959), Somogyi-Nelson reagent (Maldonado *et al.*, 2013) and using the enzymes glucose oxidase plus peroxidase (Megazyme, 2011).

Aiming an alternative and simpler method, this work evaluates and proposes the idea of correlating the TRS content with sweet potato moisture. Most of the findings and evaluations were made with data collected in the literature. The advantage of that alternative method is that only moisture analysis has to be performed, which is much simpler than starch analysis. Also, the relationship TRS x Moisture can be applied in the mass balance to estimate the ethanol potential of a given fermentation, making possible to evaluate the effect of both moisture and sweet potato concentration in the medium.

3.2 The Proposal: existence of a relationship between TRS with moisture in sweet potato

The sweet potato is composed mainly by starch and moisture; starch with mean around 20% and moisture, 70% (Bradbury e Holloway, 1988). So, it was assumed that, allowing a small error, the sum of the other components could be considered constant. Then, the mass balance results in:

$$\text{Starch (\%)} = 100 - \text{Moisture} - \text{Constant} \quad (3.1)$$

Hence comes up the relationship between only two variables: starch and moisture, which indicates that the highest starch contents occur in drier sweet potatoes.

Actually, Eq. (3.1) was the basic idea for developing an equation relating TRS and moisture, as TRS is more interesting for evaluating the ethanol production potential. The TRS concept incorporates: (i) free glucose and fructose, (ii) glucose from starch, and (iii) glucose and fructose from sucrose. The reducing sugars are glucose and fructose, and they are the carbohydrate forms assimilated by yeast during ethanol conversion. Then, to calculate the TRS, the stoichiometry presented in Figure 3.1 has to be considered.

According to the definitions, it is expected mathematical similarity between the relations starch x moisture and TRS x moisture, where the main contribution in TRS is the glucose from starch.

Hydrolysis

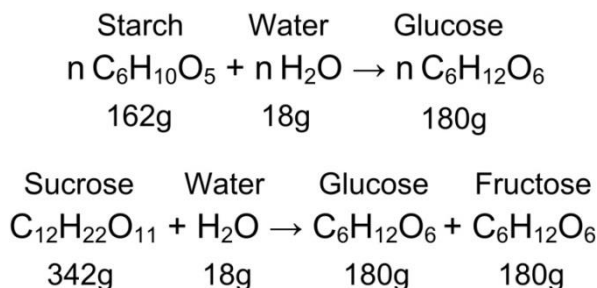


Figure 3.1: Stoichiometry of hydrolysis reactions of starch and sucrose.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Proposal verification

The considerations assumed in the proposal had to be verified. So, the existence of a correlation between TRS and moisture was evaluated with data from literature (Bradbury e Holloway, 1988; Oboh, Ologhobo e Tewe, 1989; Zhang, Wheatley e Corke, 2002). Among these data, a specific subset was selected for the parameters estimation of TRS x moisture curve, thus an equation was obtained and was employed in further analysis. The data for parameter estimation was selected considering the analytical method employed for sugars and starch determination (more details are discussed in section 3.4.1), and that the summation of centesimal composition had to be above 97.5%.

3.3.2 TRS equation results compared with other experimental data

Estimations of obtained equation were compared with experimental data from other authors (Zhang, Wheatley e Corke, 2002; Zhang *et al.*, 2011; Srichuwong *et al.*, 2012; Dewan *et al.*, 2013; Lareo *et al.*, 2013). That is, with different data from those used in parameter estimation.

Additionally, in the present work, the TRS of five different sweet potatoes were quantified by acid hydrolysis. Three of those sweet potatoes were developed by Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), which were BRS Amélia, BRS Rubissol e BRS Cuia (De Castro e Becker, 2011a; b; c) (Figure 3.2). The another two sweet potato samples were purchased at a local market in the city of Porto Alegre (Brazil), they presented physical characteristics similar to the BRS Cuia.

The sweet potato moisture was determined thermogravimetrically in kiln at 105 °C. For TRS determination, approximately 2 g of fresh crushed sweet potato, together with 25 mL of distilled water and 1 mL of hydrochloric acid, were heated in an autoclave at 1 atm for 2 h, following the method proposed by Masiero (2012). The glucose and fructose quantification was performed by HPLC, utilizing the Hi-Plex H column of Agilent Technologies, with water as the mobile phase, and the Refractive Index Detector. The column temperature was 60 °C, the mobile phase flow rate 0.6 mL.min⁻¹, and 20 µL of sample was injected.

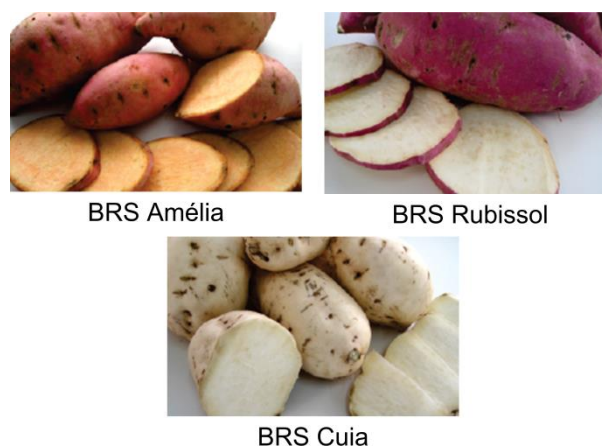


Figure 3.2: Images of sweet potato cultivars developed by Embrapa.
SOURCE: De Castro and Becker (2011a; b; c).

Using the Student's *t* distribution, was carried out the difference test between the means, i.e., the means results of TRS experimental values and the estimations by the equation.

3.3.3 Sweet potato mash and ethanol potential equation

The ethanol potential of a mash depends on the TRS content in the sweet potato, as well as the sweet potato concentration in the medium. Thus, applying mass balance, considering the TRS x moisture equation, and the hydrolysis and fermentation reactions, the equation for ethanol potential was deduced. Further details about this deduction are presented in the section 3.4.3.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Proposal verification

To validate the presumed relation between TRS and moisture, it was sought for sources with as many data as possible. So, three works were selected: Zhang, Wheatley and Corke (2002); Oboh, Ologhobo and Tewe (1989); Bradbury and Holloway (1988). In those works the linear relationship starch/carbohydrates/TRS x moisture was found. It confirmed the proposal, since starch, carbohydrates and TRS contents are tied.

3.4.1.1 Data from Zhang, Wheatley and Corke (2002)

Zhang, Wheatley and Corke (2002) studied six sweet potato genotypes; for each one, moisture, starch and sugars were quantified, as shown in Table 3.1, the TRS values are presented in the same table, which were calculated according to section 3.2.

Figure 3.3 presents starch and TRS versus moisture with the data from Table 3.1, where is noted that TRS shows a better determination coefficient than starch. It is worth pointing out that, in the course of time, occurs the action of amylases naturally present in

sweet potato, reducing the starch content and increasing the glucose content (Zhang, Wheatley e Corke, 2002). Then, it seems more consistent to correlate moisture with TRS, because in this case the total amount of glucose is considered.

Table 3.1: Moisture, sugars and starch in six genotypes of sweet potatoes, according to Zhang, Wheatley and Corke (2002). All data are on wet basis.

Genotype	Moisture	%			Starch	TRS
		Glucose	Fructose	Sucrose		
Hi-dry	66.5	1.38	0.09	0.14	24.66	29.01
Yan1	70.7	1.01	0.90	0.92	16.20	20.88
Chao1	77.4	0.86	1.06	0.91	10.58	14.62
Yubeibai	72.1	1.22	0.60	0.65	14.68	18.81
Guang7	73.1	1.10	1.05	0.91	15.49	20.32
Guang16	75.7	0.58	1.16	0.83	12.05	16.00

SOURCE: Zhang, Wheatley and Corke (2002).

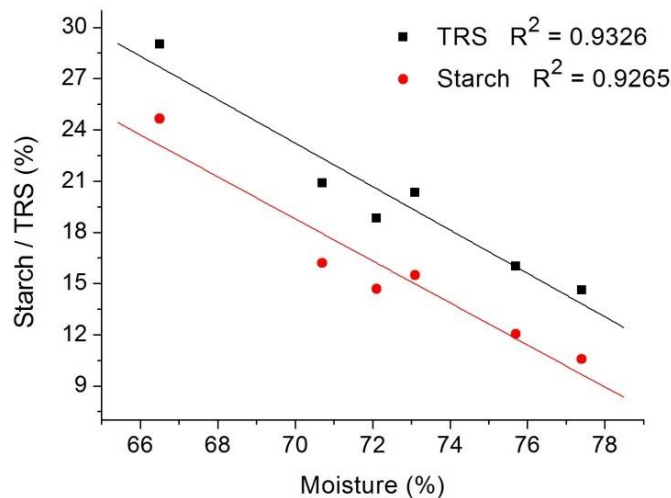


Figure 3.3: Linear correlation between moisture and Total Reducing Sugars (TRS). Data plotted from Table 3.1.

The important and useful contribution was the identification of the model:

$$TRS(\%) = ax_{MST} + b \quad (3.2)$$

where x_{MST} corresponds to the moisture content. Therefore, the quality when calculating TRS will depend on the estimation of parameters a and b .

The data from Zhang, Wheatley and Corke (2002) are important because they corroborate to the proposed relationship. However, for the parameters estimation it would be better a larger number of data.

3.4.1.2 Data from Oboh, Ologhobo and Tewe (1989)

Oboh, Ologhobo and Tewe (1989) analyzed the chemical composition of forty-nine varieties of sweet potato from International Institute of Tropical Agriculture (Nigeria). The summary of their results (mean and standard deviation (S)) is shown in Table 3.2.

Table 3.2: Average composition of forty-nine sweet potatoes (data on wet basis).

Component	Mean (%)	S
Moisture	71.46	4.01
Carbohydrates	24.63	3.37
Proteins	1.31	0.59
Lipids	0.26	0.15
Fibers	1.25	0.31
Ashes	1.15	0.40

SOURCE: Oboh, Ologhobo and Tewe (1989).

Oboh, Ologhobo and Tewe (1989) quantified moisture, proteins, lipids, fibers and ashes. The carbohydrates were calculated by the difference. Because of this, the construction of TRS equation also would have a certain problem, among the carbohydrates is not known what exactly is starch and what is sugar. However, it is still possible to find a linear correlation between carbohydrates and moisture, as can be seen in Figure 3.4.

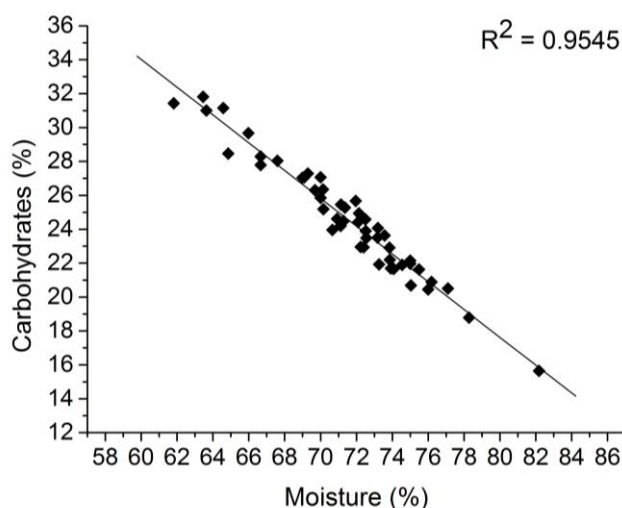


Figure 3.4: Linear correlation between moisture and carbohydrates. Data plotted extracted from Oboh, Ologhobo and Tewe (1989).

3.4.1.3 Data from Bradbury and Holloway (1988)

Finally, Bradbury and Holloway (1988) analyzed the chemical composition of seventy-three sweet potatoes, determining also the starch and sugars contents. Hence, just their data were selected for the parameters estimation.

42 A Simple equation for total reducing sugars estimation on sweet potato and ethanol yield potential

The starch content was determined by the gelatinization at 100 °C, then hydrolysis was carried out at 60 °C, catalyzed by an α -amylase and amyloglucosidase. The produced glucose was determined colorimetrically. For sugars was employed the Anthrone method, which quantifies the sum of glucose, fructose, and sucrose. The monosaccharides of these sugars are released after a sequence of reactions, then color is produced when finally react with Anthrone reagent. The sugars were quantified with a spectrophotometer and expressed as sucrose (1988).

The study of Bradbury and Holloway (1988) was done to a project of Australian Centre by International Agricultural Research, aiming to determine the chemical composition of a wide range of Pacific root crops, and took four years. The sweet potatoes were from agricultural research stations, farmer's fields or in some cases they were purchased in the market. The source countries were Fiji, Papua New Guinea, Solomon Islands, Tonga, and Western Samoa. The sweet potatoes samples had two to seven days when arrived in the laboratory, they were processed immediately or stored from one to fourteen days in a cool room maintained at 15°C. The results of analysis performed by Bradbury and Holloway (1988) are presented in in Table 3.3.

Table 3.3: Centesimal composition of seventy-three sweet potatoes from five countries in Pacific (data on a wet basis). TRS were calculated in the present work.

No.	Sweet potato	%								
		Moisture	Protein	Dietary Fibre	Fat	Ash	Starch	Sugar	TOTAL	TRS
1	Vulatolu ^f	71.2	0.71	1.72	0.11	0.74	17.9	1.35	93.73	21.31
2	14 ^e	66.6	0.63	1.24	0.13	0.57	22.7	2.42	94.29	27.77
3	Western Province(1) ^a	66.1	1.92	1.31	0.21	0.88	19.9	4.55	94.87	26.90
4	TIS 2498 ^a	70.2	1.03	0.63	0.08	0.75	20.6	2.05	95.34	25.05
5	Ngiriare ^a	69.8	1.82	0.49	0.08	0.65	20.3	2.52	95.66	25.21
6	Habare ^d	75.1	0.9	0.85	0.16	0.79	16.2	1.67	95.67	19.76
7	TIB 2 ^f	75.1	0.86	1.64	0.1	0.7	16.4	0.89	95.69	19.16
8	Vaka ^a	68.1	2.46	0.8	0.25	0.67	21.6	1.83	95.71	25.93
9	8 ^e	63.7	1.75	1.77	0.22	0.73	24.3	3.37	95.84	30.55
10	Toni ^a	73	0.69	1.13	0.11	0.76	19.3	1.13	96.12	22.63
11	3 ^e	61.2	2.25	1.3	0.14	0.59	28.4	2.45	96.33	34.13
12	5 ^e	68.3	1.56	1.27	0.21	0.54	22.5	1.97	96.35	27.07
13	Teomo ^a	74.3	0.52	2.06	0.18	0.71	14.9	3.71	96.38	20.46
14	Paipa ^d	69.5	1.38	1.4	0.14	0.74	21.9	1.52	96.58	25.93
15	Honiara ^f	76.2	0.88	1.56	0.22	0.73	16.7	0.38	96.67	18.96
16	Western Province(2) ^a	66.1	2.14	1.13	0.18	0.64	24.3	2.2	96.69	29.32
17	4 ^e	69.5	2.5	1.2	0.25	0.61	20.3	2.42	96.78	25.10
18	9 ^e	67.4	2.13	1.78	0.21	0.55	22.1	2.7	96.87	27.40
19	Kariap ^d	71	1.39	1.87	0.28	0.79	19.7	1.89	96.92	23.88
20	TIS 3017 ^f	67	1.16	1.75	0.2	0.74	24.9	1.22	96.97	28.95

Source of sweet potatoes: ^aSolomon Islands, ^bTonga, ^cLaloki Research Station in Papua New Guinea, ^dKuk Research Station in Papua New Guinea, ^eWestern Samoa and ^fFiji - The table continues.

Table 3.3 (continuation): Centesimal composition of seventy-three sweet potatoes from five countries in Pacific (data on a wet basis). TRS were calculated in the present work.

No.	Sweet potato	Moisture	Protein	Dietary Fibre	%					TOTAL	TRS
					Fat	Ash	Starch	Sugar			
21	L46 ^c	69.7	1.45	1.66	0.14	0.67	20.7	2.73	97.05	25.87	
22	TIS 3033 ^f	70.1	1.06	1.27	0.18	0.84	22.7	0.97	97.12	26.24	
23	L18 ^c	74.4	1.8	0.62	0.08	0.94	17.6	1.72	97.16	21.37	
24	Hawai ^b	68.9	1.21	1.57	0.16	0.65	22.2	2.52	97.21	27.32	
25	KRSI ^f	75.8	0.61	1.75	0.17	0.75	17.3	0.86	97.24	20.13	
26	Halasika ^b	74.2	1.01	1.13	0.18	0.79	19.2	0.87	97.38	22.25	
27	Santa Cruz(1) ^a	74	0.81	1.66	0.19	0.63	17.7	2.42	97.41	22.21	
28	Western ^a	68.3	1.63	1.49	0.15	0.87	22.3	2.7	97.44	27.62	
29	L49 ^c	69.9	2.19	0.86	0.07	0.76	20.5	3.18	97.46	26.13	
30	Siale ^b	73.5	0.46	2.16	0.18	0.93	15.9	4.39	97.52	22.29	
31	40 ^a	76.3	0.81	1.42	0.12	0.54	14.1	4.23	97.52	20.12	
32	Lai ^a	72.7	1.81	1.84	0.17	0.91	16.3	3.85	97.58	22.16	
33	Sapel ^d	71	1.51	1.93	0.22	0.77	19.8	2.45	97.68	24.58	
34	Santa Cruz(2) ^a	71.9	1.76	1.52	0.17	0.61	17.3	4.45	97.71	23.91	
35	37 ^a	72.9	1.81	3.92	0.14	0.87	12.5	5.59	97.73	19.77	
36	Melefakahau ^b	77.3	0.76	1.28	0.14	0.99	15.6	1.74	97.81	19.16	
37	Three months(1) ^a	71.9	0.91	1.33	0.16	0.79	21	1.73	97.82	25.15	
38	50 ^a	69.5	1.44	1.4	0.27	0.62	20.4	4.3	97.93	27.19	
39	Po ^d	74.8	1.12	1.31	0.13	0.71	18.3	1.59	97.96	22.01	
40	Soii ^d	73.1	1.16	1.65	0.33	0.77	18.8	2.21	98.02	23.22	
41	Drividrivi ^f	76.1	1.25	1.63	0.09	0.74	17.8	0.46	98.07	20.26	
42	Dingale ^a	71.1	2.31	1.5	0.18	0.91	20.3	1.78	98.08	24.43	
43	TIS 1499 ^f	72.3	0.92	1.84	0.24	0.8	21.1	0.91	98.11	24.40	
44	L43 ^c	69.3	1.72	1.08	0.12	0.91	21.4	3.58	98.11	27.55	
45	45 ^a	89	0.63	1.54	0.08	0.31	5.3	1.3	98.16	7.26	
46	L15 ^c	69.3	1.84	1.54	0.06	0.86	22.4	2.17	98.17	27.17	
47	Parabea ^d	73.8	1.29	1.7	0.18	0.8	18.4	2	98.17	22.55	
48	108 ^a	77.5	2.5	2.08	0.1	0.55	12.4	3.05	98.18	16.99	
49	Three months(2) ^a	73.6	2.14	1.5	0.08	0.83	17.1	2.93	98.18	22.08	
50	TIB 10 ^f	69.5	0.81	1.66	0.14	0.62	24.5	1	98.23	28.27	
51	TIS 2498 ^a	67.6	2.21	1.99	0.1	0.61	21.2	4.53	98.24	28.32	
52	Wanmun ^d	74.6	1.54	1.86	0.16	0.88	17.3	1.96	98.3	21.29	
53	L33 ^c	74.5	1.62	1.09	0.13	0.72	18.5	2.83	98.3	23.53	
54	139 ^a	63.3	1.75	3.89	0.14	0.72	24	4.56	98.36	31.47	
55	Bau ^d	67.9	1.74	1.69	0.34	0.85	24.7	1.18	98.4	28.69	
56	Mame ^d	77	1.34	1.46	0.25	0.81	15.3	2.27	98.43	19.39	
57	220 MK 10 ^a	73.6	2	1.67	0.1	0.67	16	4.43	98.47	22.44	
58	Padua ^d	69	1.43	1.4	0.2	0.85	23.6	1.99	98.47	28.32	
59	Rerfs Jimi ^a	70.4	2.34	1.22	0.09	0.72	21.8	1.98	98.55	26.31	
60	131 ^a	75.3	1.88	3.93	0.22	0.8	12.4	4.17	98.7	18.17	

Source of sweet potatoes: ^aSolomon Islands, ^bTonga, ^cLaloki Research Station in Papua New Guinea, ^dKuk Research Station in Papua New Guinea, ^eWestern Samoa and ^fFiji - The table continues.

Table 3.3 (continuation): Centesimal composition of seventy-three sweet potatoes from five countries in Pacific (data on a wet basis). TRS were calculated in the present work.

No.	Sweet potato	Moisture	Protein	Dietary Fibre	%					TOTAL	TRS
					Fat	Ash	Starch	Sugar			
61	42 ^a	69.5	1.63	4.62	0.14	0.55	18.5	3.77	98.71	24.52	
62	L16 ^c	75	1.2	1.29	0.1	0.76	17.6	2.89	98.84	22.60	
63	Tongamai ^b	68.4	0.84	1.74	0.29	0.47	23.8	3.43	98.97	30.05	
64	L29 ^c	70.4	2.23	1.29	0.06	1.06	21.8	2.19	99.03	26.53	
65	Sinulu ^a	67.5	2.93	2.33	0.13	0.65	23	2.6	99.14	28.29	
66	107 ^a	72.5	2.13	4.71	0.16	0.94	14.6	4.11	99.15	20.55	
67	Tomun ^d	73.2	0.96	1.51	0.14	0.72	21.1	1.65	99.28	25.18	
68	L9 ^c	71.3	1.28	1.39	0.14	0.78	22.1	2.41	99.4	27.09	
69	Bugotu ^a	68.6	1.31	1.61	0.48	0.72	24.3	2.67	99.69	29.81	
70	Vaka ^a	71.1	0.75	2.84	0.43	0.92	18.3	5.64	99.98	26.27	
71	Simbul sowar ^d	76	1.17	1.32	0.21	0.78	18.4	2.53	100.41	23.11	
72	158a ^a	67.4	1.81	2.26	0.21	0.73	23.8	5.03	101.24	31.74	
73	Nawaro ^a	69.7	0.87	1.85	0.3	0.62	25.4	2.83	101.57	31.20	

SOURCE: Bradbury and Holloway (1988).

Source of sweet potatoes: ^aSolomon Islands, ^bTonga, ^cLaloki Research Station in Papua New Guinea, ^dKuk Research Station in Papua New Guinea, ^eWestern Samoa and ^fFiji.

As can be seen in the column TOTAL in Table 3.3, some centesimal compositions do not match 100 %, which is normal to happen when working with chemical analysis due to measurement errors. It is supposed that the values less than 100% are a consequence of an uncompleted hydrolysis of starch, leading to an underdetermination. Therefore, for TRS x moisture model parameter estimation, only the data with TRS greater than 97.5% were selected (samples from No. 30 onwards in Table 3.3). These data were analyzed with the Minitab software, and based in the large standardized residual or a large leverage, the samples 35, 45, 54, 60, 61, 66, 71 and 73 were also removed from the final model. Then, the final model was fitted with thirty-six points, as presented Figure 3.5, and the model equation is given by Eq. (3.3).

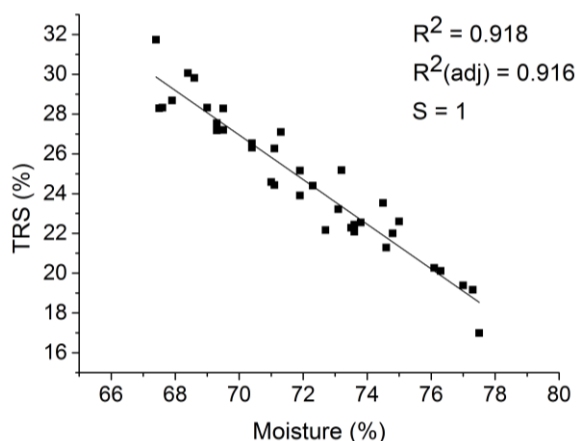


Figure 3.5: Linear correlation between moisture and Total Reducing Sugars (TRS). Data plotted with selected thirty-six samples date from Table 3.3. $R^2(\text{adj})$ means the R^2 adjusted with degrees of freedom.

$$TRS(\%) = -1.12094x_{MST} + 105.412 \pm 1 \quad (3.3)$$

3.4.2 TRS equation results compared with other experimental data

To evaluate the estimation capability of Eq. 3.3, its results were compared with experimental data not used in the calibration step, and this comparison is presented in Table 3.4.

In the experimental data applied to build Eq. 3.3, moisture varied in the range 67.4 – 77.5% (No. 72 and 48 in Table 3.3). It can be seen in Table 3.4 that there are five sweet potatoes with moisture less than 67.4%. Although it is known that extrapolation is not adequate for correlations, the five cases were maintained to get an idea of the distancing from the experimental result.

Table 3.4: Comparison between TRS estimation applying Eq. (3.3) and experimental results.

Authors	Starch quantification method	Sweet potato	Moisture	%			
				TRS _{Exp.}	TRS _{Eq.}	S _{Exp.}	S _{Eq.(1)}
Present work	Acid hydrolysis and HPLC quantification	Amélia	70.57	21.92	26.31	0.48	1
		Rubissol	70.69	26.95	26.17	0.57	
		Cuia	62.34	29.09	35.53	0.07	
		Market 1	67.83	25.60	29.38	2.42	
		Market 2	69.30	22.65	27.73	0.68	
Zhang, Wheatley and Corke ^a (2002)	Megazyme total starch assay kit	Hi-dry	66.5	29.01	30.87	0.31	
		Yan1	70.7	20.88	26.16	0.32	
		Chao1	77.4	14.62	18.65	0.69	
		Yubeibai	72.1	18.81	24.59	0.57	
		Guang7	73.1	20.32	23.47	1.10	
Zhang <i>et al.</i> (2011)	Acid hydrolysis and HPLC quantification	-	61.5	35.94	36.47	-	
		Srichuwong <i>et al.</i> (2012)	Megazyme total starch assay kit	K159	59.5	32.39	38.72
DCY	59.4			33.37	38.83	1.11	
Lareo <i>et al.</i> ^b (2013)	Hydrolysis with Megazyme's enzymes and HPLC quantification by NREL ^c method (Sluiter e Sluiter, 2005)	-	73.1	20.18	23.47	1.64	
Dewan <i>et al.</i> (2013)	Hydrolysis with Megazyme's enzymes and HPLC quantification by NREL method (Sluiter e Sluiter, 2005)	-	78.4	20.08	17.53	1.07	

^{a,b} It indicate that drying temperature was other than 105°C. ^aDrying at 40°C for 3 h, with additional drying in a freeze-dryer. ^bDrying at 60°C. ^cNREL: National Renewable Energy Laboratory (USA).

Using the Student's t distribution, was carried out the difference test between TRS_{Exp.} and TRS_{Eq.}, but it could not be applied in data from Zhang *et al.* (2011), Srichuwong *et al.* (2012) and Dewan *et al.* (2013) due to lack of information to perform the test. In all other cases, only for “Rubissol” and “Market 1” the TRS_{Exp.} and TRS_{Eq.} can be considered equal with 95% of confidence. In the case of “Market 1”, the equality occurred mainly due to greater experimental standard deviation (2.42).

Although it was found significant difference in most cases of Table 3.4, the major contribution of this study is the identification of the relationship between moisture and TRS. For a more accurate estimation is fundamental to have an equation for a particular kind of sweet potato. For this purpose, it is first necessary to characterize various samples of sweet potato under study, and then readjust the parameters equation. Therefore, for the equation accuracy it is also important to use reliable analytical methods when obtaining the experimental points. It is thought that must exist an optimal post-harvest time to carry out the analysis, considering the acting of amylases own of sweet potatoes over time, which would favor the hydrolysis in the analytical assay.

However, when there is no specific equation, the Eq. 3.3 can used to estimate the expected order of magnitude for the TRS content.

Considering the proposed methodology, the moisture analysis can be done with thermogravimetric technique, which is easy to execute, cheap and does not generate chemical waste. Furthermore, thermogravimetric technique affords the most accurate moisture content data, it is thus often applied as a reference method to validate new indirect techniques for moisture measurement (Kaatze and Hübner, 2010). Also, in order to accelerate thermogravimetric analysis, the sample drying can be done in a microwave oven. Bouraoui, Richard, and Fichtali (1993), in a review paper, presented successful approaches for a variety of food products when using the microwave drying method.

Electromagnetic techniques can be also used to determine moisture. They have rapidly developed because of their potential to provide continuous, fast and stable moisture monitoring in real time. Some of them also have the advantage of being non-invasive (Kaatze and Hübner, 2010).

3.4.3 Sweet potato mash and ethanol potential equation

To calculate the ethanol potential of a particular fermentation, the stoichiometry presented in Figure 3.1 and Figure 3.6 must be considered. In addition, the material balance has to include the dilution water, the sweet potato moisture and the ethanol density (0.789 kg.L⁻¹, when the ethanol concentration is expressed in v.v⁻¹). Dilution water is added to hydrolyze the starch and performing the fermentation.

Fermentation

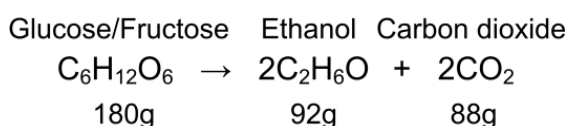


Figure 3.6: Stoichiometry reaction of monosaccharides conversion into ethanol.

The following deduction is done for an ideal condition, where is assumed that starch is fully hydrolyzed, and all sugars are completely converted into ethanol. Therefore, 1 mol of glucose (180 g) results in 2 mol of ethanol (92 g).

The amount of TRS available for fermentation also depends on the mass of sweet potato added. Therefore, it is defined the variable x_{SWP} , which represents the ratio of mass of sweet potato, in kg, to volume of dilution water, in L. So, the amount of available sugars in the medium can be calculated as $0.01 \times TRS \times x_{SWP}$. By applying the molar masses and density, it is possible to calculate the total volume of ethanol produced (v_{ETH}).

$$v_{ETH}(L) = \left(\frac{1}{0.789}\right) \left(\frac{92}{180}\right) \left(\frac{TRS}{100}\right) x_{SWP} \quad (3.4)$$

$$v_{ETH}(L) = \left(\frac{92}{142.02}\right) (0.01TRS) x_{SWP} \quad (3.5)$$

The total volume is calculated, considering also the dilution water (H_2O_{dil}), the sweet potato moisture (x_{MST} , in %) and the water consumed in the hydrolysis reaction ($H_2O_{cons\ hyd}$):

$$v_T(L) = H_2O_{dil} + \left(\frac{x_{MST}}{100}\right) x_{SWP} + v_{ETH} - H_2O_{cons\ hyd} \quad (3.6)$$

The ratio of sweet potato to dilution water is given in kg:L, i.e. x_{SWP} (kg) to 1 L of dilution water. In addition, the water consumed in the hydrolysis is $(18/180)(0.01TRS)x_{SWP}$ (considering the stoichiometry in Figure 3.1). Therefore, Eq. (3.6) becomes:

$$v_T(L) = 1 + \left(\frac{x_{MST}}{100}\right) x_{SWP} + \left(\frac{92}{142.02}\right) (0.01TRS) x_{SWP} - \left(\frac{18}{180}\right) (0.01TRS) x_{SWP} \quad (3.7)$$

$$v_T(L) = 1 + \left(\frac{x_{MST}}{100}\right) x_{SWP} + \left(\frac{77.8}{142.02}\right) (0.01TRS) x_{SWP} \quad (3.8)$$

With Eq. (3.5) and Eq. (3.8) is possible to estimate the ethanol content of a given fermentation (x_{ETH}), through v_{ETH}/v_T . Taking this relation and multiplying to 100, to transform to %, the result is:

$$x_{ETH}(\%, v. v^{-1}) = 100 \frac{\left(\frac{92}{142.02}\right) (0.01TRS) x_{SWP}}{1 + \left(\frac{x_{MST}}{100}\right) x_{SWP} + \left(\frac{77.8}{142.02}\right) (0.01TRS) x_{SWP}} \quad (3.9)$$

If the numerator and denominator are multiplied by 142.02:

$$x_{ETH}(\%, v. v^{-1}) = \frac{9200(0.01TRS) x_{SWP}}{142.02 + 1.4202x_{MST} x_{SWP} + 77.8(0.01TRS) x_{SWP}} \quad (3.10)$$

48 A Simple equation for total reducing sugars estimation on sweet potato and ethanol yield potential

Using the equation of TRS (Eq. (3.3)), results in:

$$x_{ETH}(\%, v.v^{-1}) = \frac{9200(-0.01121x_{MST} + 1.05412)x_{SWP}}{142.02 + 1.4202x_{MST}x_{SWP} + 77.8(-0.01121x_{MST} + 1.05412)x_{SWP}} \quad (3.11)$$

3.4.3.1. Effect of sweet potato moisture and concentration in the ethanol potential yield

From Eq. (3.11) it can be seen that ethanol potential depends on sweet potato concentration (x_{SWP}) and moisture (x_{MST}). Therefore, it is interesting to evaluate the influence of those variables.

There are studies upon ethanol production with high concentration of feedstock. Thus, the evaluation of x_{SWP} influence is important in this subject. The particular condition of high feedstock concentration is called Very High Gravity (VHG) fermentation. Work with VHG is interesting because of the following advantages: lower water consumption for dilution, higher ethanol concentration in wine, reduction of effluent, lower power consumption (since it works with less mass) and the need of smaller vessels (since it works with lower volume).

The ethanol content of 10 - 12% (v.v⁻¹) is the range generally observed in the wine of most ethanol distilleries all over the world. The VHG fermentation results, for different starchy raw materials, have been between 15 - 17% (v.v⁻¹), according to Puligundla *et al.* (2011). Additionally, it is interesting to mention that Thomas and Ingledew (1992), with wheat mash, had achieved the ethanol level of 21% (v.v⁻¹) under VHG conditions.

Therefore, to evaluate how the sweet potato increasing concentration in the mash and sweet potato moisture affects ethanol potential, Eq. (3.11) was plotted and is presented in Figure 3.7.

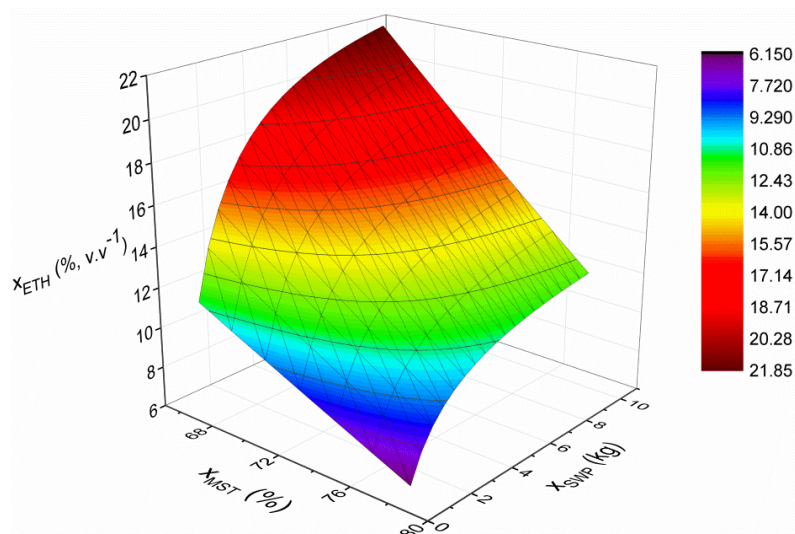


Figure 3.7: Ethanol potential in function of sweet potato moisture (x_{MST}) and concentration (x_{SWP} : 1 L of dilution water).

As can be seen in Figure 3.7, the behavior is non-linear for x_{SWP} and linear for x_{MST} . There is a maximum point in the non-linear part, and it happens when x_{SWP} tends to infinity or when no dilution water is added. Considering the last condition, in Eq. (3.11) the maximum is found by removing “142.02” from the denominator, which corresponds to the dilution water contribution. In fact, the 1 L of dilution water was multiplied by the factor of 142.02, as can be seen in the deduction of Eq. (3.6) to Eq. (3.11). So, when the “142.02” is removed, x_{SWP} can be cut, the result is an equation that is only dependent on the moisture (Eq. (3.12)).

$$x_{ETH}(\%, v.v^{-1}) = 100 \frac{-1.03126x_{MST} + 96.979}{0.54813x_{MST} + 82.00843} \quad (3.12)$$

It is important to know the maximum given by Eq. 3.12, however, it is not so simple to get this order of magnitude. According to Cao *et al.* (2011), there is some limitation in the VHG fermentation when using root and tuber mashes, resulting from their highly viscous nature. The high viscosity causes handling difficulties during the process and may lead to some negative effects, like an incomplete hydrolysis of starch, low fermentation efficiency and problem on solid-liquid separation.

When the mash is prepared, besides the compound of interest, which is the starch, others sweet potato components are also present. The cell wall constituents are responsible for the high viscosity of fermented mash. They are cellulose, hemicellulose and pectic substances. Nevertheless, some studies have reported good fermentative results when those components were degraded with enzymatic treatment.

Zhang *et al.* (2011), working with sweet potato, reached 16 % (v.v⁻¹) using a xylanase (an hemicellulose disintegrating enzyme), Cao *et al.* (2011) 15.5 % (v.v⁻¹) using a celulase and Srichuwong *et al.* (2012) 15.1 – 15.4 % (v.v⁻¹), working with a mixture of enzymes active upon pectic substances, hemicellulose and cellulose.

Also, it is important to comment that x_{SWP} has major influence on the initial concentrations, after that there is a stabilization, so does not matter anymore if the sweet potato concentration is increased (as shown in Figure 3.7). In the other hand, evaluating the influence of variable x_{MST} , it is noted that always is desirable to work with drier sweet potatoes, since they lead to higher ethanol potential contents.

3.5 Conclusions

The starch content of a given sweet potato is one of the main factors that determine the final ethanol production. Sweet potato is mainly composed of starch and moisture. Thus, assuming a certain error, the other constituents can be considered constant, leading to TRS content estimation only from the moisture measurement.

Considering de relation TRS x moisture, an equation was proposed to estimate the ethanol potential of a given fermentation. It was shown that the ethanol potential increases with sweet potato concentration and the behavior is non-linear, there is a maximum in the function. It is interesting to know this maximum as a reference.

Increasing the concentration of sweet potatoes causes difficulty because the viscosity also increases. However, in some studies upon VHG fermentations improvements were achieved when additional enzymes are used to reduce mash viscosity.

Also, it is important take to account the sweet potato moisture, because the drier sweet potatoes result in the greater ethanol potentials. So, through this point, it is more desirable to work with sweet potatoes drier than increasing its concentration in the mash.

Finally, it is highlighted that the major contribution of this study is the identification of the relationship between moisture and TRS. So far, there have been no studies that have made this association. The equations presented in this paper are a proposal, if someone wants greater precision, can apply the central idea to construct new equations for more specific cases. The suggested method has the advantages that moisture measurement is simple, involves cheaper apparatus and does not generate chemical waste.

3.6 References

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (OMA) Online** 2016. Disponível em: < <http://www.eoma.aoc.org/> >. Acesso em: 18 jan.

BOURAOUI, M.; RICHARD, P.; FICHTALI, J. A review of moisture content determination in foods using microwave oven drying. **Food Research International**, v. 26, n. 1, p. 49-57, 1993. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-38249004867&partnerID=40&md5=209acd8b7346939e18c51fb9a4245c19> >.

BRADBURY, J. H.; HOLLOWAY, W. D. Chemistry of Tropical Root Crops: significance for nutrition and agriculture in the Pacific. **ACIAR Monograph No. 6**. Melbourne: Ramsay Ware Printing 1988.

CAO, Y. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato powder for the production of ethanol under conditions of very high gravity. **Front Chem Sci Eng**, v. 5, n. 3, p. 318-324, 2011.

DE CARVALHO, G. G. P.; FERNANDES, F. E. D. P.; PIRES, A. J. V. Métodos de determinação dos teores de amido e pectina em alimentos para animais. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. VII, p. 1-12, 2006. ISSN 1695-7504. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63612648004> >.

DE CASTRO, L. A. S.; BECKER, A. **Batata-doce BRS Amélia**. Pelotas: Embrapa 2011a.

_____. **Batata-doce BRS Cuia**. Pelotas: Embrapa 2011b.

_____. **Batata-doce BRS Rubissol**. Pelotas: EMBRAPA 2011c.

DE SOUZA, A. P. *et al.* Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 1, p. 24-35,

2014 2014. ISSN 1939-1242. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-013-9366-8> >.

DEWAN, A. *et al.* Saccharification and Fermentation of Waste Sweet Potato for Bioethanol Production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 6, p. 739-747, 2013. ISSN 1745-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12042> >.

FIGUEIREDO, E. 043/IV Amido. In: (Ed.). **Métodos físico-químicos para a análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. cap. IV, p.133-134.

KAATZE, U.; HÜBNER, C. Electromagnetic techniques for moisture content determination of materials. **Measurement Science and Technology**, v. 21, n. 8, p. 082001, 2010. ISSN 0957-0233. Disponível em: < <http://stacks.iop.org/0957-0233/21/i=8/a=082001> >.

LAREO, C. *et al.* Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 493, 2013. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.springerplus.com/content/2/1/493> >.

MALDONADE, I. R. *et al.* Comunicado Técnico 86: Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. **Embrapa**, 2013. Disponível em: < http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_86.pdf >.

MASIERO, S. S. **Microusinas de etanol de batata-doce: viabilidade econômica e técnica**: Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012.

MCCLEARY, B. V. *et al.* Measurement of carbohydrates in grain, feed and food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 11, p. 1648-1661, 2006. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2497> >.

MEGAZYME. **Total Starch Assay Procedure (Amyloglucosidase / α -amylase method)**: Megazyme International Ireland, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959/03/01 1959. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030> >. Acesso em: 2014/09/04.

OBOH, S.; OLOGHOB, A.; TEWE, O. Some aspects of the biochemistry and nutritional value of the sweet potato (*Ipomea batatas*). **Food Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 9-18, // 1989. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0308814689901465> >.

PULIGUNDLA, P. *et al.* Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80052475026&partnerID=40&md5=923b7b7ea611c97112d796407a11bef9> >.

REN, J. *et al.* Determining the life cycle energy efficiency of six biofuel systems in China: A Data Envelopment Analysis. **Bioresource Technology**, v. 162, n. 0, p. 1-7, 6// 2014. ISSN

0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414004106> >.

SLUITER, A.; SLUITER, J. **Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC**: Technical Report NREL/TP-510-42624. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005.

SRICHUWONG, S. *et al.* Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 120-127, 2012. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84857791562&partnerID=40&md5=f9a48974cef716e947fe10f1e8c54bb3> >.

THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 61-68, 1992/07/01 1992. ISSN 0169-4146. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01583635> >.

ZHANG, L. *et al.* Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4573-4579, 2011. ISSN 09608524 (ISSN). Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79551690009&partnerID=40&md5=1e8e3fa41ed909deb3a4c9add3e2a7d3> >.

ZHANG, Z.; WHEATLEY, C. C.; CORKE, H. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 3, p. 317-325, 4// 2002. ISSN 0925-5214. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521401001491> >.

ZHAO, L. *et al.* Mechanistic elucidation of apoptosis and cell cycle arrest induced by 5-hydroxymethylfurfural, the important role of ROS-mediated signaling pathways. **Food Research International**, v. 66, p. 186-196, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84907951450&partnerID=40&md5=b3ca62ef2651c1169b6f7a59e21b0c9b> >.

Capítulo 4 – Study of sweet potato starch hydrolysis for total glucose quantification

Abstract

Sweet potato is a feedstock that stands out for having high starch content, being interesting for ethanol production. Therefore, the starch hydrolysis and total glucose measurement is important to know the ethanol potential of a given sweet potato. In this work were carried out different tests to determine total glucose in sweet potato, evaluating the effect of different factors. The enzymatic kit sold by Megazyme was adopted as reference to evaluate the others. Comparing assays with fresh and dried sweet potatoes, and using the Megazyme's method, the fresh demonstrated to be better than with dry, as glucose quantification was about 27% higher. The commercial enzyme mixture Stargen 002, which was developed for the ethanol production market, was tested for the analytical purpose; the comparison was with acid hydrolysis and the Megazyme's method. The use of Stargen 002 was not successful. The best result was 16% (w/w) glucose content, whereas, for the same sample, Megazyme's method resulted in 29% and acid hydrolysis, 27%. Although results with Stargen 002 have not been positive, hydrolysis may be improved with more studies, intensifying agitation and investigating the dosage. Is important that this kind of research continues to be realized, enhancing methods to glucose quantification, providing more accurate estimates for the ethanol potential of a given feedstock.

Keywords: Sweet potato, starch, enzymatic hydrolysis, acid hydrolysis, glucose measurement.

4.1 Introduction

The sweet potato is a feedstock that stands out for having high starch content. Thus, it has stimulated interest on researchers for the ethanol production (Zhang *et al.*, 2011; Srichuwong *et al.*, 2012; Dewan *et al.*, 2013). Although the starch content is high, there is a considerable variation, around 13 - 28% w/w, depending on a number of factors, such as the kind of sweet potato and growing conditions. (Bradbury e Holloway, 1988), therefore the starch measurement is important to know the ethanol potential of a given sweet potato.

The principle of starch quantification is its hydrolysis and then the measurement of glucose produced. In fact, when the focus is ethanol production the more interesting thing is the total glucose that may serve as a substrate for the yeast, i.e., the glucose from the starch combined to the already available free one.

In ethanol production studies, it is very important that overall glucose analysis is effective, because it serves as a reference to evaluate the performance of conversion into ethanol. Glucose underestimation may lead to an erroneous conclusion about the maximum theoretical ethanol production.

The starch hydrolysis can be made by acidic heating or enzymatic process. The acidic reaction has the disadvantage that hexoses may be degraded into 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) (Zhao *et al.*, 2014), leading to an underestimation. The established method by AOAC (Association of Official Analytical Chemists) is the enzymatic (method 996.11) (McCleary *et al.*, 2006; AOAC, 2016).

The Megazyme company produces a kit for starch determination, that can be applied to any starchy material. The hydrolysis is enzymatic and the glucose quantification is in spectrophotometer (Megazyme, 2011). This kit has been widely referenced in analysis of starch content (Zhang, Wheatley e Corke, 2002; Sluiter e Sluiter, 2005; Srichuwong *et al.*, 2012; Dewan *et al.*, 2013).

Based on data found in the literature about different sweet potatoes compositions, Schweinberger *et al.* (2015) proposed an equation to estimate the total reducing sugars (TRS) using the moisture content in sweet potato. The equation resulted in consistent values until a certain extent. The partial limitation was noticed in Schweinberger *et al.* (2016), when the process of Simultaneous Hydrolysis and Fermentation (SHF) was improved. This study evaluated the effect of post-harvest time until the sweet potatoes processing, and the ethanol production peak was found in 25 days, also presenting ethanol content higher than expected with the proposed equation, indicating that the sweet potato had more starch than theoretically predicted. The positive effect of ripening was attributed to the gradual action of amylases naturally present in sweet potatoes, which collaborated in the hydrolysis summed to the fungal amylases, which were added latter for the SHF.

In this work, several tests were performed to determine total glucose in sweet potato, evaluating the effect of different factors such as sample preparation (fresh and dried); acid hydrolysis; enzymatic hydrolysis using the Megazyme's method and; enzymatic hydrolysis employing the commercial enzyme mixture Stargen 002[®] with some variations. Stargen 002 was originally developed to the ethanol production market, and here its applicability in analytical measurement was tested. The Megazyme's method, using the

Total Starch Assay Kit®, was selected as a reference for comparison with the others methods. In the studies of hydrolysis performance, sweet potato was ripe for 25 days, in order to enhance the reaction.

4.2 Materials and methods

This study comprised three stages, where a summary is given in Table 4.1.

Table 4.1: Summary of what was investigated in this study.

	Hydrolysis method	Investigated factors	Glucose quantification
Stage 1	Megazyme	Sweet potato:	- HPLC
		- Fresh	- Spectrophotometer
	- Megazyme		- HPLC
Stage 2	- Stargen 002	- Stirring	- HPLC
	- Acid	- Dosage	- HPLC
	- Megazyme		- HPLC
Stage 3	- Stargen 002	- Stirring	- HPLC
		- Buffer solution	- HPLC
		- Presence of peel	- HPLC
	- Acid	- Presence of peel	- HPLC
			- Spectrophotometer

In the first stage was compared two sweet potato preprocessing methods, raw vs. dried, and the hydrolysis was performed only according to the Megazyme procedure, so the best processing method was selected to the next stages.

In the second and third stages were evaluated hydrolysis performances, comparing the results with Megazyme's kit, Stargen 002 and acid hydrolysis. Samples were processed after 25 days of ripening, according to Schweinberger *et al.* (2016). The ripening was not conducted in the first stage because the hydrolysis method did not varied (only Megazyme procedure), so possible implications due to not ripening was the same for both sample preparations.

Methodology was kept constant when Megazyme's kit was used, also in acid hydrolysis, variations was done when Stargen 002 was employed. More details about these issues are given in the section 4.2.4 of methodology, and in the “results” section.

4.2.1 Amylases

The Megazyme's Total Starch Assay Kit® comprises a thermostable α -amylase and a glucoamylase. It is not informed the microorganism that produces such amylases. α -

Amylase activity is informed as 1600 U/mL, on Ceralpha reagent at pH 5.0 and 40°C. Glucoamylase activity is informed as 3300 U/mL on soluble starch at pH 4.5 and 40°C (or 200 U/mL on p-nitrophenyl β -D-maltoside). The Ceralpha reagent and p-nitrophenyl β -D-maltoside substrates are also commercialized by Megazyme (Megazyme, 2011).

Stargen 002 is a mixture of enzymes; it contains *Aspergillus kawachi* α -amylase expressed in *Trichoderma reesei* and glucoamylase from *Trichoderma reesei*. The declared enzyme activity is 570 GAU/g (Genencor, 2009). GAU is one Glucoamylase Unit (GAU), determined in assay with p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside as substrate, at pH 4.3 and 30°C (Genencor, 1999).

Despite the enzymatic activities being reported, the direct comparison is difficult, because the tests to determine enzyme activity are on different conditions and with different substrates. Therefore, in the present work it was decided to mention the enzymatic doses as volume added instead of enzyme activity.

4.2.2 Sample preparation

In the Megazyme method is stated that the sample must be crushed to pass a 0.5 mm screen. This is not possible with fresh sweet potato. With a very intense grinding, the resulting potato mash is very cohesive and does not pass through a 0.5 mm screen. With a milder grinding in domestic processor (500 W) was possible to pass a 2 mm screen, and it has determined the pre-processing conditions when working with fresh sweet potato.

In the second method of preparation, sweet potato was dried at 60°C for 8 hours, and then it was milled and passed along a 0.5 mm screen.

The fresh sweet potato samples were placed in assay tubes in quantities of about 200 mg, and for dried samples, 100 mg. The masses were calculated estimating that amount of starch in fresh and dry samples were approximate, then the amount of dry sample was smaller because it was more concentrated in starch due to drying.

In the methodology of this work, the reagent doses are given in mL/100 mg of sample. Thus, for fresh sweet potato was added a larger volume of reagents, but this does not interfere in the result because the concentrations were equivalent. For example, although the volume of enzymes for fresh sweet potato was increased, the volume of buffer solution was also increased in the same proportion, so the amylases concentration remained the same in both sample preparations.

4.2.3 Prehydrolysis

In the Megazyme's method is applied a prehydrolysis treatment; therefore, it was also used in the Stargen 002 hydrolysis.

Ethanol (80 % v/v) was added in the volume of 0.2 mL/100 mg of sample, to wet and aid the dispersion, the tube was stirred on a vortex mixer. Then, dimethyl sulphoxide (DMSO) was added (2 mL/100 mg of sample), the tube was stirred on a vortex mixer, this mixture was placed in a boiling water bath and removed after 5 min. The pretreatment with DMSO is done aiming to break the hydrogen bonds between amylose molecules, making the starch more susceptible to enzymatic attack (Megazyme, 2011).

4.2.4 Hydrolysis of starch

In the acid hydrolysis, approximately 2g of fresh grinded sweet potato, together with 25 mL of distilled water and 1 mL of hydrochloric acid (37%, w/w), were heated in an autoclave at 1 atm for 2 h. This methodology was based on Masiero (2012), where between 45 min and 2,5 h, the point of 2 h of hydrolysis was the best, with higher glucose quantification and lower standard deviation.

About processes with enzymatic hydrolysis, Figure 4.1 shows methodologies employed.

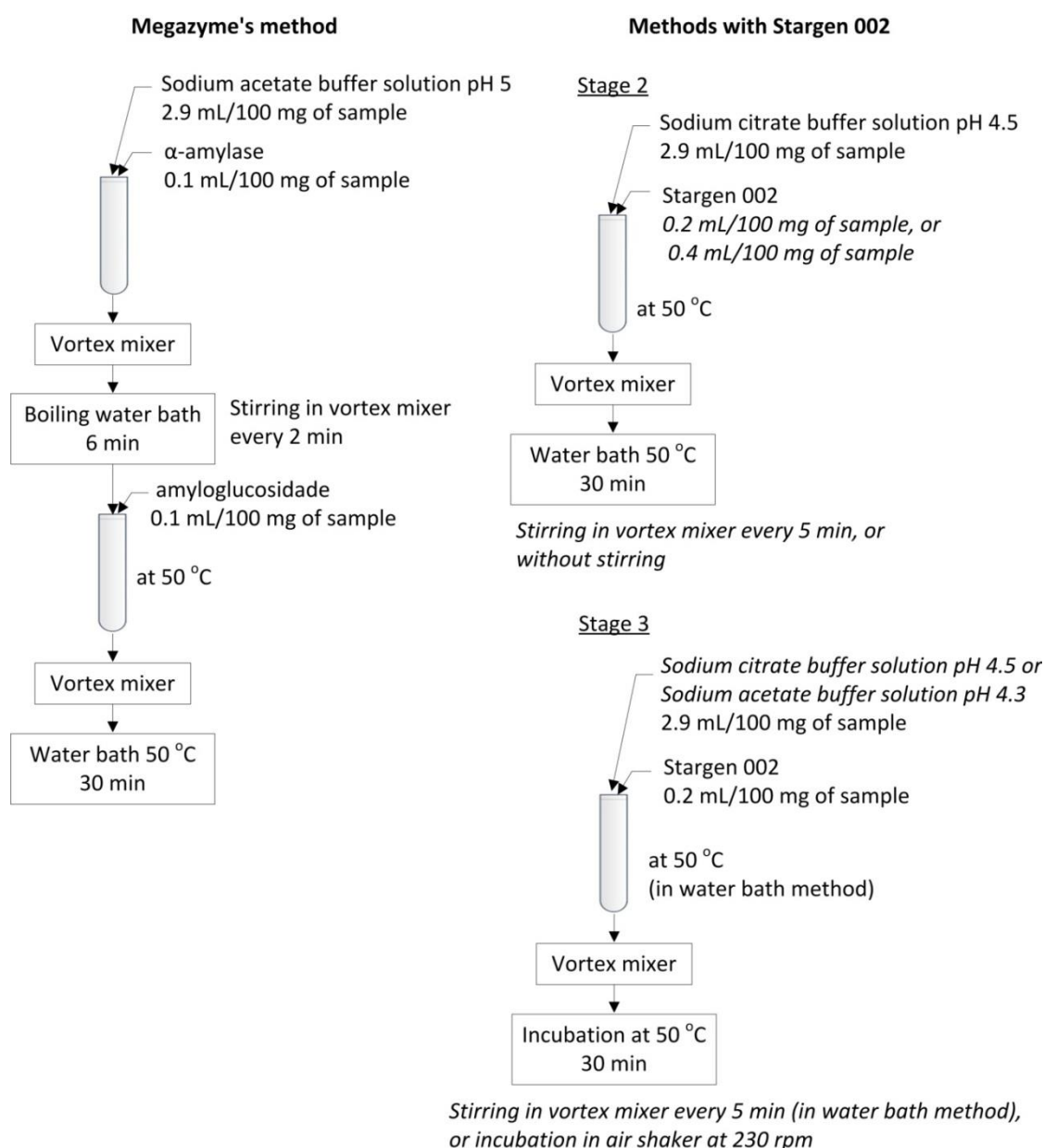


Figure 4.1: Processes of enzymatic hydrolysis employed, which were carried out after the prehydrolysis.

When the enzymes from Megazyme were applied, the whole process was conducted at pH 5 with sodium acetate buffer solution, as shown in Figure 4.1. It is noteworthy, this

method may be performed at pH 7 in the α -amylase step and at pH 4.5 in the glucoamylase step, if these pH values are applied the method is exactly in accordance with the official method AOAC 996.11. However, the Megazyme's manual contains a comparative study, demonstrating negligible differences between results with official method and with pH 5. Then, the buffer pH 5 was chosen for practical reasons (Megazyme, 2011).

In the second stage of this study, the enzyme mixture Stargen 002 was tested in sodium citrate buffer solution pH 4.5, as practiced in some SHF experiments in Schweinberger (2015). In the third stage the sodium acetate buffer solution pH 4.3 was also tested, since this is the buffer reported in the standard method for glucoamylase activity in Genencor (1999), and this test was applied by the manufacturer to Stargen 002. Other variables tested with Stargen 002 are shown more clearly through Figure 4.1, where which was investigated is highlighted in italics.

In the methods with Stargen 002 there is no heating in boiling water bath (as occurred in Megazyme's method), because Stargen 002 is a mixture of α -amylase and glucoamylase, and the high temperature would inactivate glucoamylase. Thus, it was made the simplification of heating only at 50°C. It was known that Stargen 002 has a good performance of 50°C, based on Masiero (2012), who pre-treated sweet potato mashes with Stargen 002 at the following temperatures: 32°C, 42°C, 52°C and 62°C, the best hydrolysis result was achieved at 52°C.

In the method with Stargen 002, was studied the need of stirring during incubation at 50°C, since there is stirring in the Megazyme procedure in the boiling water step. Also, it is noteworthy that the dose for Stargen 002 of 0.2 mL/100 mg of sample was stipulated as the sum of doses of α -amylase and glucoamylase employed in the Megazyme's method.

Since the agitation importance was identified, experiments were also carried out in air shaker. The equipment used was to 250 mL flasks, and then an adaptation was made, where the test tubes were inserted into empty Erlenmeyer flasks.

As shown in Figure 4.1, with water bath the Stargen 002 addition was at 50°C. In the case of shaker, the Stargen 002 addition was at ambient temperature, and was measured that the volume in the test tube took about 45 min to reach 50°C (with the equipment already at 50°C), then only from this point the 30 min shown in Figure 4.1 was counted.

4.2.5 *Glucose quantification*

For glucose quantification, the Megazyme kit comprises an enzyme mixture of glucose oxidase and peroxidase. The sequence of reactions begins with glucose and ends with quinoneimine dye, responsible for the color formation, then the measurement can be carried out in a spectrophotometer. Hence, when glucose measurement was through spectrophotometer, model T80+ of PG Instruments was used and the reading was performed at 510 nm. More details about the method can be found in Megazyme (2011).

When HPLC was applied, column Hi-Plex H of Agilent was used, with water as the mobile phase. The column temperature was 60°C, the detector used was RID (Refractive Index detector), the mobile phase flow rate was 0.6 mL/min, and injected sample volume was 20 μ L.

4.2.6 Moisture determination

This measurement was done thermogravimetrically in a kiln at 105°C (in triplicate).

4.2.7 TRS theoretical estimation

As already discussed in the introduction, based on data found in the literature about different sweet potatoes compositions, Schweinberger *et al.* (2015) proposed an equation to estimate the total reducing sugars (TRS) from the moisture content in sweet potato, Eq. (4.1), where the data employed in the curve adjustment had moisture in the range of 67.4 – 77.5%.

$$TRS(\%) = -1.12094 \times Moisture + 105.412 \quad (4.1)$$

The data used by authors were from a wide variety of sweet potatoes. So, for a more accurate estimation, to a specific group of sweet potatoes, it would be necessary generate new data points to a new curve fitting. Although the equation requires some accuracy improvement (Schweinberger *et al.*, 2015; Schweinberger *et al.*, 2016), it is still interesting to get an idea of the magnitude to expect from experimental results, since TRS is mainly composed by glucose.

4.2.8 Statistical analysis

The Minitab software was used for apply the Tukey's test, when the means equality was tested.

4.3 Results

4.3.1 Stage 1

The first stage results can be seen in Table 4.2, where CV is the coefficient of variation, that is, the ratio between standard deviation and the mean.

Sweet potatoes in these experiments were analyzed with the peel, and had moisture of 64%, which is below the range used in the TRS equation adjustment (Eq. (4.1)). However, only to get an idea, when the equation is applied it results in the theoretical value for TRS of 33.67%.

Table 4.2: Results of stage 1. Total glucose content, given in % (w/w) and in wet basis. CV is also given in %.

Sample preparation	Fresh		Dried	
	Spectrophotometer	HPLC	Spectrophotometer	HPLC
1	29.60	Ins. sample ^a	21.01	20.64
2	27.27	28.38	24.19	21.62
3	25.28	27.03	21.82	22.75
4	31.40	32.83	25.37	24.69
Mean ^b	28.39 ^A	29.41 ^A	23.10 ^B	22.42 ^B
CV	9.42	10.31	8.78	7.76

^aInsufficient sample, unfortunately much of this sample was lost, then the analysis in HPLC became unfeasible.

^bThe means that do not share the same letter are significantly different, according to the Tukey test with 95% of confidence.

In this first stage, the results showed a clear superiority of fresh sweet potato upon the dry. A reason that may justify is the observed cohesion of the dry flour during hydrolysis. At the α -amylase step in boiling water, was observed that dried potato flour was aggregated, even with high speed agitation (vortexing) the block disintegration was difficult. At the end of complete hydrolysis process, the block vanished, but during the process the initial aggregation hindered the α -amylase access, reflecting on the result of low glucose release. With fresh sweet potatoes, this phenomenon was much less significant. There was some initial aggregation, but it was easily disintegrated, allowing the stirring as a suspension. The tubes images, with fresh and dried potato after stirring (in α -amylase step) can be seen in Figure 4.2.

About the glucose detection methods, via HPLC and spectrophotometer, both showed be equally good. It was noticed the good color stability formed with the reaction mixture coming in the Megazyme's kit, so the results presented satisfactory reproducibility when the measuring was through spectrophotometer, even after more than 1 hour after the reaction.

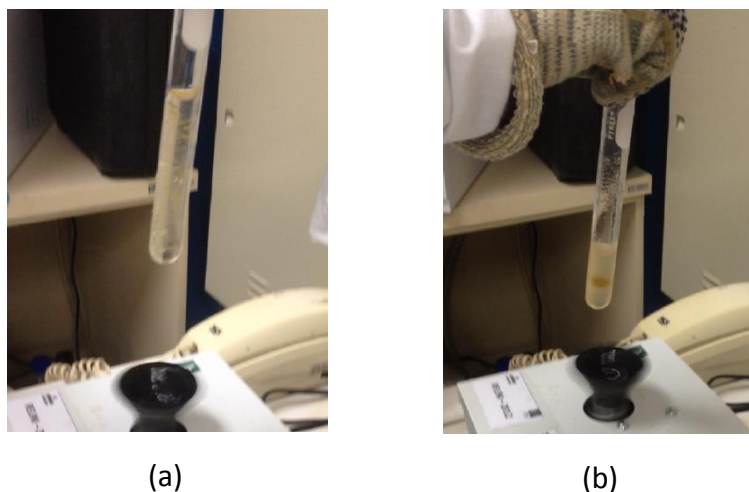


Figure 4.2: Tubes images after stirring (in α -amylase step), (a) fresh sweet potato and (b) sweet potato flour.

In the following stages, sweet potato was only analyzed in the fresh form, and analyzes were carried out preferably by HPLC, being more practical and without producing reaction residue.

4.3.2 Stage 2

Sweet potatoes in these experiments were analyzed with the peel, and had moisture of 71.71%, which resulted in the theoretical value of 25.03% for TRS, according to Eq. (4.1).

When Stargen 002 samples were analyzed, it was discovered an additional glucose content in the enzymatic mixture (average of 23% w/v). Then, blanks only with Stargen 002 dosage had to be made to discount in the results. It is understandable that Stargen 002 has sugars in its composition, as they are part of the medium used for microorganisms cultivation, which produced the enzymes. It would not be the interest of the manufacturer to remove the sugars from the extract, since Stargen 002 has not been developed for analytical purposes. The amount of glucose carried by Stargen 002 significantly impacted the media, where the dose of 0.2 mL/100 mg of sample is equal to 2000 times that used in the SHF experiments in Schweinberger (2015).

At this stage, experiments with Stargen 002 were at a dose of 0.2 mL/100 mg (with or without stirring), and the dose of 0.4 mL/100 mg (without stirring). In the last case, results were rather negative, with all glucose content of less than 2% (w/w), and therefore are not shown, the other results can be seen in Table 4.3 (all measured in HPLC).

From the results of Table 4.3 is noted that with Megazyme's method results were more consistent and less variable. With acid hydrolysis results were consistent at some extent to the the Megazyme's method, but one point (14.80%) was well below the others. Compared with Megazyme's method, methods with Stargen 002 resulted in significantly lower contents and, due to the high variability in the results, the Tukey's test did not accuse difference between stirring or not, but it seems that if the agitation would be intensified a better performance could be obtained.

Table 4.3: Results of stage 2. Total glucose content, given in % (w/w) and in wet basis. CV is also given in %.

Replicate	Megazyme	Stargen 002 (0.2 mL/100 mg)		Acid hydrolysis
		Stirring	Without stirring	
1	21.86	20.98	8.75	14.80
2	27.26	12.52	7.43	25.35
3	22.11	12.98	8.73	24.44
4	23.92	7.86	13.61	Analysis in tripl. ^a
Mean ^b	23.79 ^A	13.59 ^{B,C}	9.63 ^C	21.53 ^{A,B}
CV	10.48	40.08	28.26	27.15

^aAnalysis in triplicate, by mistake the quadruplicate was not done.

^bThe means that do not share the same letter are significantly different, according to the Tukey test with 95% of confidence.

Due to inconsistencies observed in the results with Stargen 002 and acid hydrolysis, these methods continued to be investigated in the following experiments, where more details are given in stage 3 of this study.

4.3.3 Stage 3

Sweet potatoes without peel had moisture of 66.88%, whereas with peel presented moisture of 67.91%. Considering the average value (67.39%), the theoretical TRS content results in 29.87%. In the enzymatic hydrolysis methods, all glucose determinations were by HPLC. In acid hydrolysis, glucose was also measured by spectrophotometer, due to an uncertainty that arose by HPLC analysis, which is further discussed in this text.

In the results shown in Table 4.4 the Tukey's test was performed on two blocks, the first comparing Megazyme's method and Stargen 002, so the averages are accompanied with capital letters, and the second comparing Megazyme's method and acid hydrolysis, so the averages are accompanied with small letters. This division was made because otherwise it would cause a high mean square error, as there are many differences between all results. A high mean square error is not desirable because it decreases the selectivity to identify differences.

Aiming an efficiency increasing with Stargen 002, it was investigated whether the peel, buffer solution and stirring method cause some interference in the hydrolysis. From the results of Table 4.4, it is observed that the peel presence did not caused significant influence (shown in Stargen 002, Water bath and S. acetate, which means the sodium acetate buffer solution). Similarly, the buffer solution did not resulted in significant difference.

Table 4.4: Results of stage 3. Total glucose content, given in % (w/w) and in wet basis. CV is also given in %.

Rep.	Meg. No peel	Stargen 002				Acid hydrolysis			
		Water bath		Shaker		HPLC		Spectrophot.	
		S. acetate No peel	S. acetate Peel	S. citrate Peel	S. acetate Peel	No peel	Peel	No peel	Peel
1	31.54	15.24	15.34	10.90	8.07	25.37	49.72	27.23	27.75
2	28.38	12.87	15.77	13.80	14.75	42.66	26.40	23.97	27.35
3	28.10	11.92	17.59	14.99	11.57	40.49	40.33	27.25	26.70
4	29.09	16.65	**	**	**	25.13	38.25	27.85	26.02
Mean*	29.28 ^{A,a}	14.17 ^B	16.24 ^B	13.23 ^B	11.47 ^B	33.41 ^a	38.67 ^a	26.57 ^a	26.95 ^a
CV	5.34	15.25	7.37	15.89	29.14	28.35	24.79	6.63	2.80

*The means that do not share the same letter are significantly different, according to the Tukey test with 95% of confidence.

** These results were discarded because the glucose content was less than 5%.

Comparing the theoretical TRS and the result with Megazyme's method, in all cases with Stargen 002 and water bath the glucose production was insufficient. Then, it was conducted another experiment in an air shaker, taking advantage of the continuous

agitation. However, there was a limitation in the stirring: the maximum speed of the equipment was 240 rpm, but in practice it is limited to 230 rpm, due to collisions of the tray on the equipment walls. In this condition the desired agitation was not obtained, since during the entire process the sample remained deposited in the bottom of the test tube. Despite this observation, the experiment was conducted, because even if the sweet potatoes did not move, there was the movement of the solution in the test tube, and perhaps this could contribute to a net positive effect. However, in fact, the hydrolysis has not been improved, as can be seen in the result presented in Table 4.4.

When acid hydrolysis samples were analyzed by HPLC many showed glucose contents ~40% (w/w), being rather than expected through the theoretical value for TRS and the Megazyme's method result, both around 30%. It is thought that some other component with similar retention time as glucose affected the results, perhaps an unknown component produced in the reaction, or something brought by the sample itself. Since the analysis with spectrophotometer showed to be reliable in stage 1, this measurement was done here with acid hydrolysis samples. Thus, the other components with retention time close to glucose which influence in the HPLC analysis does not interfere in the spectrophotometer analysis. Due to the specificity, only glucose reacts with glucose oxidase enzyme, following a sequence of reactions of the method, and then forming quinoneimine dye, responsible for the color formation.

As can be seen in Table 4.4, the results measured with spectrophotometer were more consistent and reliable than with HPLC, being around 27%. It is noticed that three HPLC analyzes had been in that magnitude (25 – 26%), so it is thought that this base is more realistic for the acid hydrolysis results. Therefore, from these results, the acid hydrolysis showed no significant difference with Megazyme's method, according to the Tukey's test. The HPLC analysis also showed no significant difference due to the high coefficient of variability. It is noteworthy that, although the acid hydrolysis measurements were discrepant with HPLC, it is not suggested to discard this detection method, but more tests should be done to find the problem source.

4.4 Discussion

In starch hydrolysis, besides the importance of a reliable method, it is also desirable to be practical and cheap, especially in cases when there are many assays to be performed.

In the three stages of this study, the results obtained with Megazyme's kit were good and consistency, being the glucose values in the magnitude of TRS theoretical.

Although Megazyme's method is reliable, it is more expensive. In terms of reagents, the costs per analysis can be estimated as: Megazyme US\$ 7.16; acid hydrolysis US\$ 0.0081 and; Stargen 002 US\$ 0.0022.

In the third stage of this research, the glucose content obtained with acid hydrolysis, with and without peel, and measured in spectrophotometer results in an average of 26.76%. The result with Megazyme's method was 9.4% higher. However, the acid hydrolysis demonstrated to be promising, considering that there was no significant difference with Megazyme's method through Tukey's test. Initially, was supposed that glucose degradation to furfurals could be an underestimation problem in acid hydrolysis,

but results showed that this did not cause relevant implication. Emphasizing also, that acid hydrolysis may be more studied aiming its enhancement, investigating factors such as the type and acid concentration, reaction time and temperature.

Concerning the results with Stargen 002, despite they were not positive through the modifications, it is thought that with more research the method could be improved, because Stargen 002 has shown good performance in hydrolysis and fermentation studies (Schweinberger *et al.*, 2016). Perhaps a more vigorous and continuous stirring in the hydrolysis may be enough to achieve good results, but the reaction time and dosage are also variables that should be investigated. Concerning the dosage, lower concentrations may lead to better results, because it was found in stage 2 that twice the dose resulted in glucose contents below 2% w/w. As Stargen 002 carries glucose in its composition, perhaps the high product concentration in the medium has inhibited the amyolytic activity. Another suggestion is the hydrolysis performed with microwave, as it seems that microwaves have a nonthermal effect of amylases activity enhancement (Saifuddin e Hussain, 2011). If the method with Stargen 002 was improved, it would have the advantage of being safer and more practical than acid hydrolysis.

4.5 Conclusion

Through the experiments some issues were clarified: it is better to use fresh sweet potato instead of dried, and the presence of the peel does not interfere in the result. Knowing this, the experiment becomes more practical, since it is not necessary dry and remove the peel.

Results obtained with Megazyme's method were consistent, as expected. Among other tested methods, acid hydrolysis was more promising, being at the same level that Megazyme according to Tukey's test. Concerning hydrolysis with Stargen 002, it is not advisable to discard this possibility, but more tests should be carried out to its improvement, where a more intense agitation and the dose reduction are important factors to be studied.

It is important that this kind of research should be continued, enhancing methods to maximize glucose quantification. Preferably, taking into consideration practicality and reduced cost analysis.

4.6 References

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (OMA) Online** 2016. Available in: < <http://www.eoma.aoac.org/> >. Acesso em: 18 jan.

BRADBURY, J. H.; HOLLOWAY, W. D. Chemistry of Tropical Root Crops: significance for nutrition and agriculture in the Pacific. **ACIAR Monograph No. 6**. Melbourne: Ramsay Ware Printing 1988.

DEWAN, A. *et al.* Saccharification and Fermentation of Waste Sweet Potato for Bioethanol Production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 6, p. 739-747, 2013. ISSN 1745-4530. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12042> >.

GENENCOR. **Standard Test Method: Glucoamylase. Method Number: C100-02.** Genencor International Inc., 1999.

_____. **STARGEN™ 002. Granular Starch Hydrolyzing Enzyme for Ethanol Production.** Danisco US Inc., 2009.

MASIERO, S. S. **Microusinas de etanol de batata-doce: viabilidade econômica e técnica.** Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012.

MCCLEARY, B. V. *et al.* Measurement of carbohydrates in grain, feed and food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 11, p. 1648-1661, 2006. ISSN 1097-0010. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2497> >.

MEGAZYME. **Total Starch Assay Procedure (Amyloglucosidase / α -amylase method).** Megazyme International Ireland, 2011.

SAIFUDDIN, N.; HUSSAIN, R. Microwave Assisted Bioethanol Production from Sago Starch by Co-Culturing of Ragi Tapai and *Saccharomyces Cerevisiae* **Journal of Mathematics and Statistics**, p. 198-206, 2011.

SCHWEINBERGER, C. M. **Inovação e Otimização no Processo de Produção de Etanol a Partir de Batata-doce.** Porto Alegre: Qualifying Project for PhD Thesis in Chemical Engineering, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2015.

SCHWEINBERGER, C. M. *et al.* Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods, and cost analysis. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 2016. ISSN 1939-019X. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.22441> >.

_____. A simple equation for ethanol yield estimation from sweet potato. In: (Ed.). **Inovação e Otimização no Processo de Produção de Etanol a Partir de Batata-doce.** Porto Alegre: Qualifying Project for PhD Thesis in Chemical Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 2015.

SLUITER, A.; SLUITER, J. **Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC. Technical Report NREL/TP-510-42624.** National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005.

SRICHUWONG, S. *et al.* Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 120-127, 2012. Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84857791562&partnerID=40&md5=f9a48974cef716e947fe10f1e8c54bb3> >.

ZHANG, L. *et al.* Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and

industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4573-4579, 2011. ISSN 09608524 (ISSN). Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79551690009&partnerID=40&md5=1e8e3fa41ed909deb3a4c9add3e2a7d3> >.

ZHANG, Z.; WHEATLEY, C. C.; CORKE, H. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 3, p. 317-325, 4// 2002. ISSN 0925-5214. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521401001491> >.

ZHAO, L. *et al.* Mechanistic elucidation of apoptosis and cell cycle arrest induced by 5-hydroxymethylfurfural, the important role of ROS-mediated signaling pathways. **Food Research International**, v. 66, p. 186-196, 2014. Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84907951450&partnerID=40&md5=b3ca62ef2651c1169b6f7a59e21b0c9b> >.

PARTE II

Processo fermentativo

Capítulo 5 – Definição das condições e processos operacionais – visão macro

Neste Capítulo são apresentados quatro estudos, onde os dois primeiros geraram o artigo “Estudo sobre a temperatura de liquefação e utilização de micro-ondas no processo de hidrólise do amido de batata-doce para a produção de etanol”, publicado nos anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ 2014) (Schweinberger *et al.*, 2014).

Neste capítulo, a metodologia aplicada à caracterização da batata-doce é apresentada na primeira seção, e na seguinte são descritas as enzimas utilizadas e as condições gerais dos experimentos. As demais seções se referem aos estudos propriamente ditos, onde para cada estudo são comentados os objetivos, metodologia experimental, resultados e discussão. Na última seção, de considerações finais, são discutidos os motivos que levaram à seleção do processo adotado como base de estudo nesta tese.

5.1 Métodos analíticos

As batatas utilizadas nestes experimentos foram caracterizadas, onde foi medido o teor de umidade, frutose e glicose total, que consiste na glicose livre somada com aquela proveniente do amido. O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico em estufa a 105°C. Os monossacarídeos, glicose e frutose, foram determinados após a extração com álcool, onde aproximadamente 15 g de batata junto com 100 mL de álcool 70% (v/v) e 0,5 g de carbonato de cálcio foram aquecidos em banho-maria a 85°C durante 1 h. Na determinação de glicose total, aproximadamente 2 g de batata fresca triturada junto com 25 mL de água destilada e 1 mL de ácido clorídrico foram aquecidos em autoclave a 1 atm durante 2 h. Os métodos descritos foram baseados no que consta em Masiero (2012). Nesta caracterização, três ou mais batatas foram trituradas em processador doméstico. O conteúdo foi homogeneizado para a amostragem e os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras de hidrólise enzimática e fermentação foram centrifugadas a 5241g durante 30 min e o sobrenadante foi analisado.

A determinação de açúcares e etanol foi efetuada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com a coluna Hi-Plex H da Agilent, tendo como fase móvel água. A temperatura da coluna foi de 60°C, o detector utilizado foi RID (*Refractive Index Detector*), a vazão da fase móvel foi de 0,6 mL/min e volume de amostra injetado foi de 20 µL.

5.2 Enzimas utilizadas e condições gerais dos experimentos

Diferentes enzimas comerciais foram empregadas nos estudos. Na Tabela 5.1 é apresentado um resumo descritivo de tais enzimas, segundo as informações dos fabricantes.

Tabela 5.1: Resumo descritivo das enzimas testadas, segundo informações dos fabricantes^a.

Enzima comercial	Composição	Recomendações de operação
Emprego: Liquefação		
Spezyme RSL (Genencor/DuPont)	Enzimas de <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Trichoderma reesei</i>	Condições ótimas pH: 5 – 5,3 Temperatura: 83 – 88°C
GC 626 (Genencor/DuPont)	α -amilase de <i>Aspergillus kawachi</i> expressa em <i>Trichoderma reesei</i>	Condições ótimas pH: 3,5 – 4 Temperatura: 62 – 68°C
Emprego: Sacarificação Simultânea com a Fermentação		
Distillase SSF (Genencor/DuPont)	α -amilase, glucoamilase e Aspergillopepsin 1 (protease), todas produzidas por cepas geneticamente modificadas de <i>Trichoderma reesei</i>	pH: 4 – 5,5 Fermentação: 28 – 35°C
Emprego: Redução da Viscosidade		
Pectinex Ultra AFP (Novozymes)	Pectinase de <i>Aspergillus aculeatus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Ativa entre 10 – 60°C, pH 2,2 – 5, pH ótimo: 3 – 4,2
Optimash BG (Genencor/DuPont)	β -glucanase e xilanase de cepas geneticamente modificadas de <i>Trichoderma reesei</i> . Enzimas atuantes sobre a celulose e hemicelulose	Condições ótimas pH: 4 Temperatura: 70°C

^aAs atividades enzimáticas não estão apresentadas porque foram declaradas em unidades diferentes, dificultando a comparação.

Nas fermentações foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa CAT-1 produzida pela LNF. Segundo o fabricante, a CAT-1 foi selecionada visando o reciclo na

indústria da cana. No material informativo não constavam as recomendações de temperatura e pH, apenas que a levedura tolera até 15% (v/v) de etanol e que é altamente resistente aos choques de pH. Desta forma, a referência inicial de dosagem e para as condições fermentativas foi o descrito em Masiero (2012), que utilizou a CAT-1 a 32°C e pH 4,5.

O pH foi controlado por meio de solução tampão de ácido cítrico e citrato de sódio. Para o controle de contaminações foram empregados 10 mL de solução do antibiótico doxiciclina na concentração 3,4 g/L.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL com conteúdo de mosto de 200 g. A incubação foi realizada em shaker a ar sob a agitação de 175 rpm.

As médias dos resultados foram comparadas aplicando o teste de Tukey (Minitab Inc., 2016).

5.3 Estudo 1: Efeito da temperatura de liquefação na hidrólise

O objetivo ao planejar este estudo foi a redução da temperatura de liquefação, o que implicaria em um menor consumo energético.

Iniciou-se o estudo empregando o processo já bem consolidado para matérias-primas amiláceas, de liquefação seguida pela SSF. Adicionalmente foi realizada uma etapa prévia de redução da viscosidade, que se fez necessária ao se utilizar uma elevada concentração de batata-doce, que nestes experimentos foi de 2 kg: 1 L (batata doce: água de diluição). A enzima Pectinex Ultra AFP foi utilizada para a redução da viscosidade, onde as condições experimentais de temperatura, pH, tempo e dosagem foram definidas com base na ficha técnica do fabricante.

A batata-doce foi triturada em processador doméstico (400 W), a água de diluição foi adicionada e os demais detalhes da metodologia experimental são apresentados na Figura 5.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Chama-se a atenção de que a liquefação a 85°C foi realizada em banho-maria, devido à limitação de temperatura do shaker, sendo assim, a agitação foi manual e a cada 5 minutos do tempo total do processo (1 h, conforme indicado na Figura 5.1). Neste estudo foi realizada apenas a hidrólise e, portanto, o parâmetro medido e avaliado foi a concentração de glicose no meio após o processo.

Como pode ser visto na Figura 5.1, no primeiro experimento a enzima Spezyme RSL foi empregada na sua condição ótima de temperatura, e que também consiste em uma temperatura usualmente praticada na liquefação. No segundo experimento, visou-se verificar o efeito no processo com a Spezyme RSL sendo a liquefação realizada em uma temperatura relativamente abaixo do intervalo ótimo. No terceiro experimento foram utilizadas a GC 626 e a Spezyme RSL, a GC 626 já foi inserida na etapa de redução de viscosidade, onde o pH era favorável para a sua atuação mas a temperatura não estava no seu intervalo ótimo, contudo, o tempo em tal etapa foi mais longo (2 h), na sequência o pH foi ajustado para favorecer a Spezyme RSL e o processo de liquefação foi conduzido a 70°C, ou seja, uma temperatura favorecendo mais a GC 626 e um pH favorecendo mais a Spezyme. Por fim, o quarto experimento foi realizado apenas com a GC 626 como

enzima para a liquefação e assim como no terceiro experimento, a GC 626 já foi adicionada na etapa de redução de viscosidade e em seguida a liquefação foi conduzida dentro das condições ótimas desta enzima.

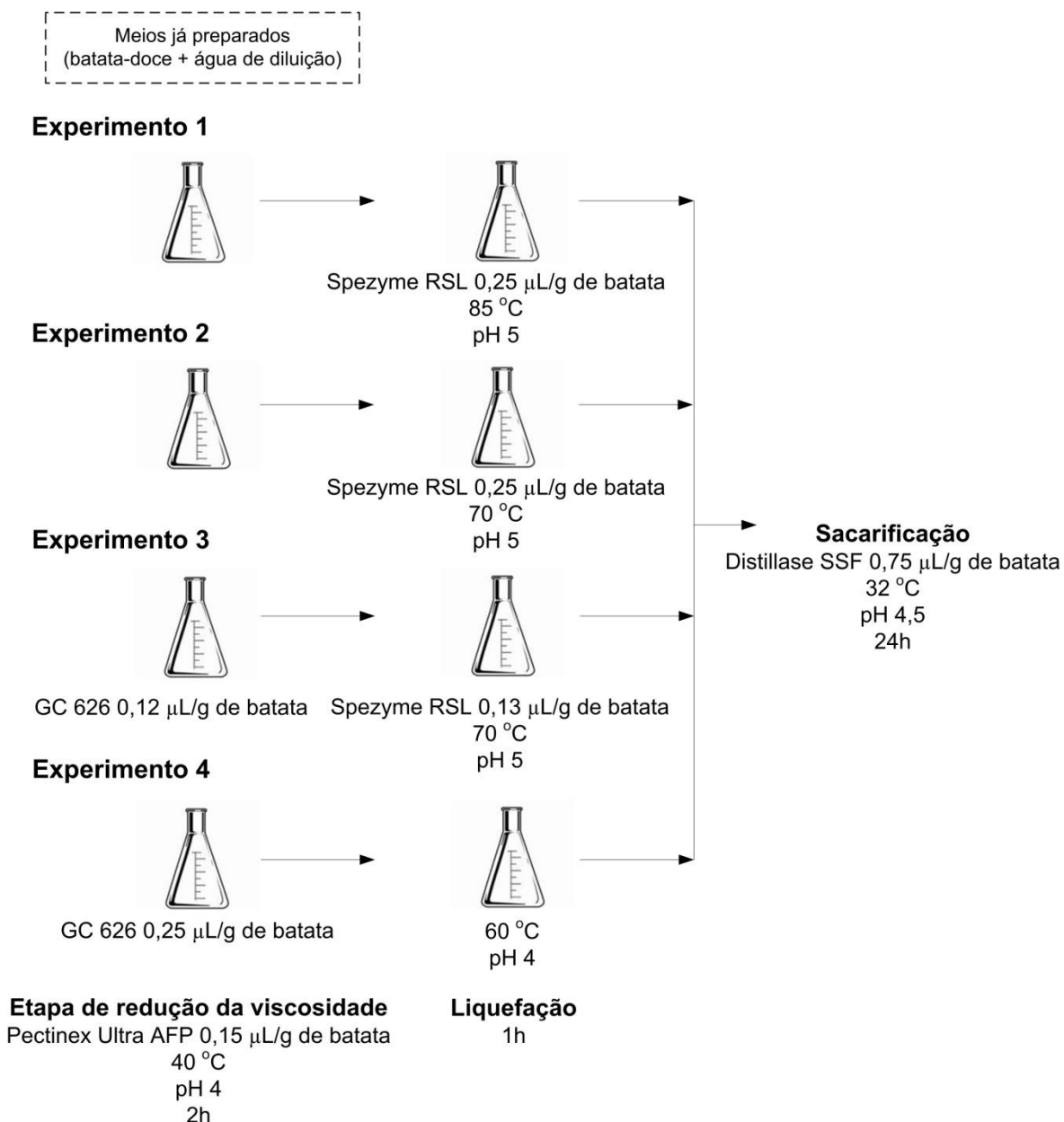


Figura 5.1: Metodologia empregada no estudo sobre o efeito da temperatura de liquefação na hidrólise.

Os resultados deste estudo são apresentados na Tabela 5.2, onde se pode observar que a temperatura exerceu efeito notável sobre o resultado da hidrólise.

Considerando os dados da caracterização da batata e a concentração da mesma no meio, o resultado teórico esperado na hidrólise era de $169,84 \pm 10,76$ g/L, o que indica que apenas no experimento 1 o resultado foi satisfatório.

Segundo Srichuwong *et al.* (2012), em geral a gelatinização do amido de batata-doce ocorre entre 60 a 85°C. O melhor resultado obtido na temperatura de 85°C provavelmente se deve ao maior grau de gelatinização do amido. Os ensaios a 85°C apresentaram diferença visível em relação aos demais, ocorrendo um maior escurecimento, grânulos mais entumecidos e vítreos, que são características físicas da gelatinização.

Tabela 5.2: Resultados do estudo sobre o efeito da temperatura de liquefação na hidrólise.

Experimento	Temperatura de liquefação (°C)	Enzima	Concentração média de glicose (g/L)	Desvio padrão
1	85	Spezyme RSL	173,24	4,63
2	70	Spezyme RSL	70,99	3,07
3	70	Spezyme RSL + GC 626	68,08	2,53
4	60	GC 626	42,04	1,08

No que se refere à comparação do desempenho das duas enzimas de liquefação testadas, os resultados não são muito conclusivos. Avaliando os resultados dos experimentos 2 e 3 aparentemente não há diferença, mas, para uma afirmação mais correta, seriam necessários mais experimentos ampliando a abrangência das variáveis de estudo. Entretanto, este ponto não foi foco de investigação nos estudos seguintes.

5.4 Estudo 2: Emprego de micro-ondas no processo (pré-aquecimento)

Considerando que no GIMSCOP se tem realizado pesquisas com micro-ondas, este estudo foi elaborado visando identificar o potencial de sua utilização no processo. Duas questões deram origem a este estudo:

- Se for adicionada uma etapa de pré-aquecimento em micro-ondas a temperatura de liquefação pode ser reduzida?
- O emprego do micro-ondas possui algum efeito de degradação sobre as substâncias da parede celular de modo a dispensar a etapa de redução de viscosidade?

Com base no resultado do Estudo 1, apenas a enzima Spezyme RSL foi selecionada para este segundo estudo, e também foi estabelecida a temperatura de 85°C para ser atingida no pré-aquecimento com micro-ondas (aparelho doméstico, 1400 W e 2450 MHz).

As condições experimentais foram baseadas no que está apresentado na Figura 5.1 para o experimento 1, os parâmetros que sofreram alterações são comentados na sequência do texto.

Neste estudo também foi realizada a fermentação, conduzida simultaneamente com a sacarificação, a dosagem da levedura foi de 17,5 mg/g de batata. Visando a redução da viscosidade do meio, a concentração de batata-doce foi reduzida de 2:1 para 1,5:1 (kg:L), esta concentração foi mantida fixa tanto nos estudos que seguem neste capítulo, bem como nos demais experimentos dos capítulos seguintes desta tese.

Foram realizados três experimentos com quatro repetições. Para fins de comparação, o primeiro experimento consistiu em reproduzir a metodologia descrita na Figura 5.1 para o experimento 1. No segundo e terceiro experimento não foi realizada a etapa de redução de viscosidade, e o aquecimento prévio em micro-ondas foi adicionado. A diferença entre os experimentos 2 e 3 consistiu na temperatura de liquefação, onde no segundo foi de 70°C e no terceiro de 60°C. Um melhor entendimento sobre a metodologia descrita pode ser obtido através da Figura 5.2, ressaltando que logo após o aquecimento em micro-ondas a enzima Spezyme RSL foi adicionada (com os meios ainda a 85°C). Também, é importante mencionar que para realizar a SSF os meios foram resfriados com água corrente em temperatura ambiente. Os resultados destes experimentos são apresentados na Tabela 5.3.

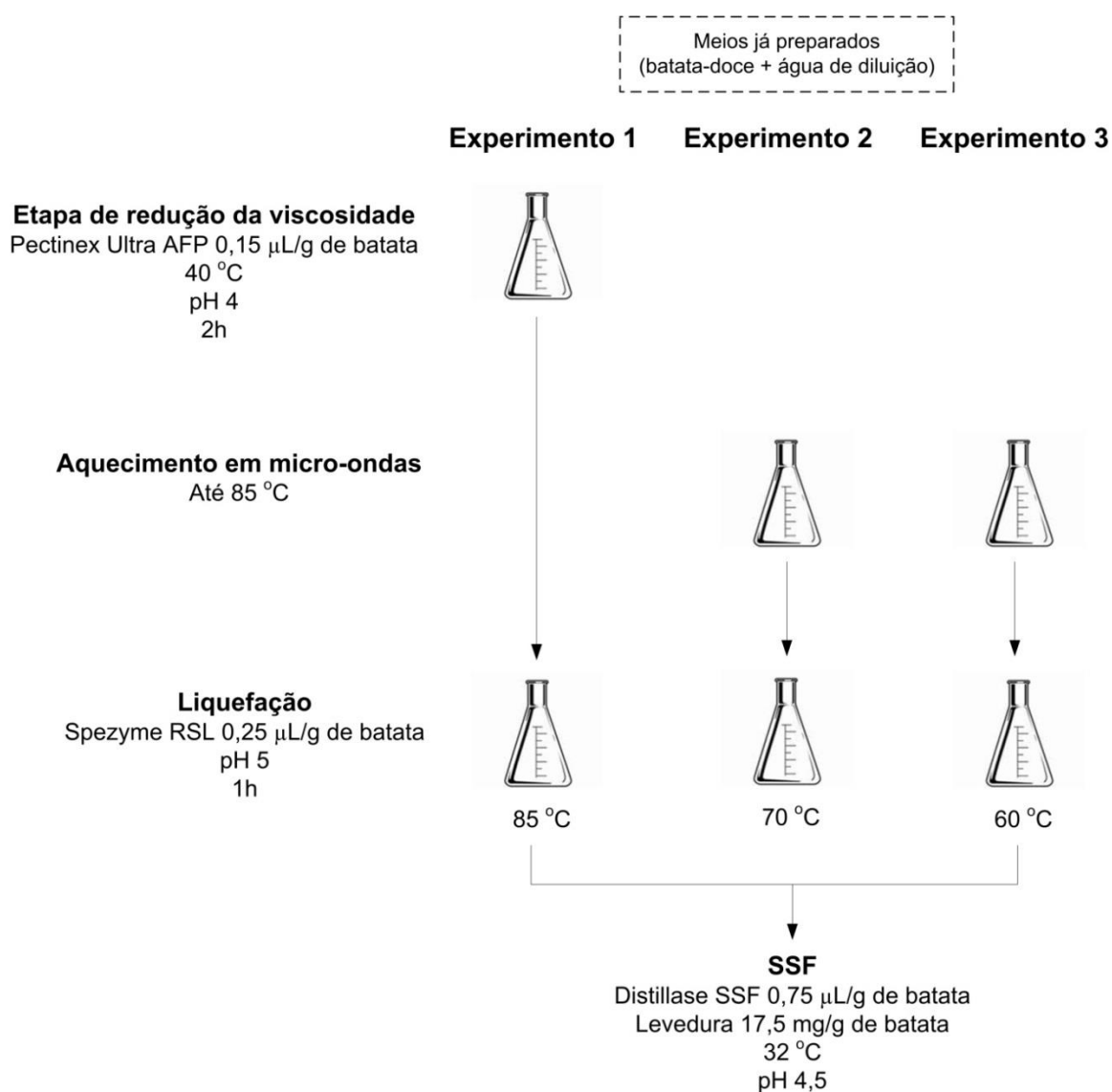


Figura 5.2: Metodologia empregada no estudo com aquecimento prévio em micro-ondas.

Tabela 5.3: Produção de etanol em diferentes condições de processos.

Experimento	Etanol (% v/v)			
	24 h		48 h	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	10,82	0,57	10,72	0,37
2	9,5	0,4	10,4	0,42
3	9,63	0,12	10,4	0,25

Com base nos resultados da caracterização da batata, o valor teórico máximo de etanol foi calculado como 11,13%. Considerando a média dos três experimentos em 48 h, calcula-se uma eficiência de conversão de 94%.

Uma das questões iniciais deste estudo foi se o emprego do micro-ondas dispensaria a etapa de redução de viscosidade, e por isto ela não foi realizada nos experimentos 2 e 3. Contudo, concluiu-se que as micro-ondas não substituem o efeito da Pectinex Ultra AFP, devido à notável diferença observada entre os experimentos em que a etapa de redução de viscosidade foi realizada e não (Figura 5.3). Não foi possível a medição da viscosidade, pois até então não se tinha viscosímetro (quando este equipamento foi adquirido a análise de viscosidade foi realizada e os resultados são apresentados capítulo 7 desta tese).

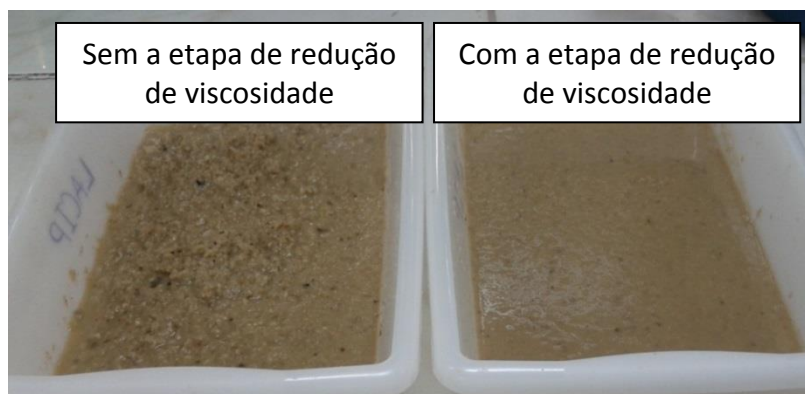


Figura 5.3: Imagem comparativa de experimentos com e sem a etapa de redução de viscosidade.

Em 24 h de fermentação a produção de etanol no experimento 1 foi um pouco mais elevada em relação às demais, talvez pela presença da Pectinex Ultra AFP, que pode ter implicado em uma breve aceleração do processo pela redução da viscosidade. Mas, após 48 h de fermentação, os resultados se equiparam.

5.5 Estudo 3: Liquefação realizada em micro-ondas

Os resultados do Estudo 2 foram interessantes porque indicaram a possibilidade de reduzir a temperatura de liquefação, mas, se questionou: “E se a Spezyme estivesse presente durante o aquecimento em micro-ondas, seria possível realizar a liquefação nesta etapa?”

Saifuddin e Hussain (2011), Zhang *et al.* (2012) e Zhang *et al.* (2011), avaliaram o efeito das micro-ondas sobre as enzimas amilolíticas, em todos os trabalhos há o relato de que o desempenho da atividade enzimática foi potencializado. Os resultados de Saifuddin e Hussain (2011) demonstraram que a hidrólise enzimática do amido de sagu combinada com as micro-ondas aumentou a taxa de reação inicial duas vezes. Segundo os autores, os resultados indicam que há uma ativação específica não térmica sobre as enzimas causada pelas micro-ondas.

Pelos motivos expostos, neste terceiro estudo foi realizado um experimento de hidrólise (em triplicata) com os seguintes processos: (i) etapa de redução de viscosidade, (ii) aquecimento em micro-ondas até se atingir a temperatura de 85°C, e já com a Spezyme RSL presente, isto para a realização da liquefação durante tal processo e por fim, (iii) a sacarificação, onde após o aquecimento no micro-ondas se aguardou que a temperatura baixasse até 32°C, então a Distillase SSF foi adicionada e a sacarificação foi realizada.

Em outro estudo, não detalhado nesta tese, foram realizados experimentos visando reduzir a dose da Pectinex Ultra AFP, pois este insumo possui elevado custo, cotado em 158,3 R\$/L (valor cotado em fevereiro/2015). Mesmo nas condições inicialmente estipuladas (Pectinex Ultra AFP: 0,15 µL/g de batata e processo de 2 h), após o processo de redução de viscosidade o meio se apresentava semissólido, a fluidez somente era notada durante o processo de sacarificação. Nos estudos objetivando a redução da dose da Pectinex Ultra AFP, viu-se que o prolongamento do tempo levava a um meio fluido na própria etapa de redução de viscosidade. Portanto, neste terceiro estudo a dose aplicada da Pectinex Ultra AFP foi reduzida para 0,10 µL/g de batata, e o tempo da etapa de redução de viscosidade foi aumentado para 16 h.

Uma melhor visualização da metodologia empregada neste estudo pode ser obtida através da Figura 5.4.

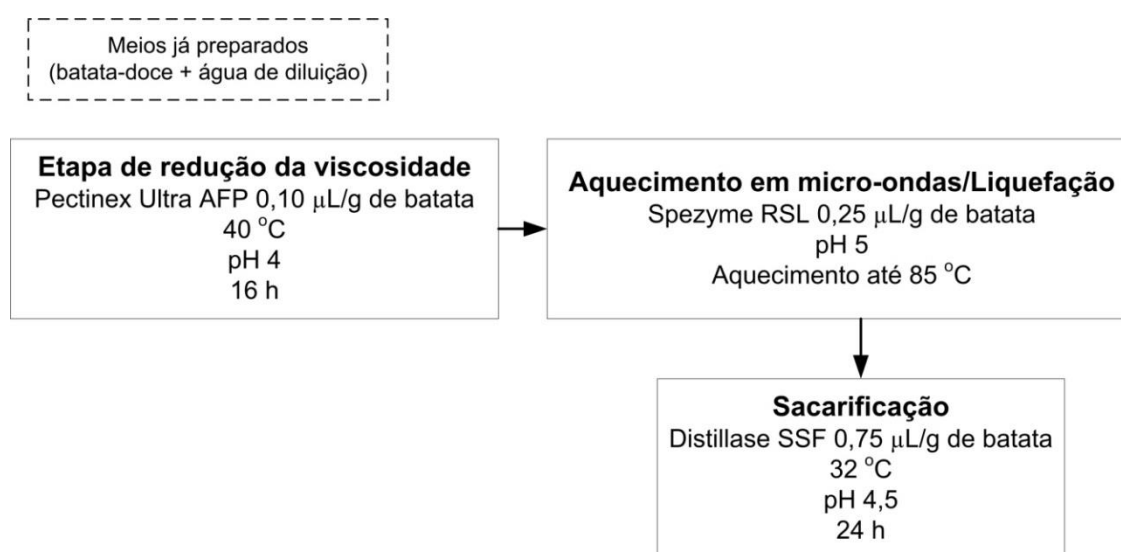


Figura 5.4: Metodologia empregada no estudo de liquefação em micro-ondas.

Durante o aquecimento no micro-ondas o processo foi interrompido quatro vezes, para a realização de rápidas agitações manuais, onde a mistura foi fácil de executar

devido à fluidez do meio.

Como resultado, obteve-se um teor de glicose de $199,89 \pm 4,05$ g/L. Contudo, segundo a caracterização da batata, esperava-se o valor máximo de 136,59 g/L, o que significa que com a hidrólise em micro-ondas o resultado foi 46% superior ao previsto pela caracterização. Para justificar tal discrepância, um argumento seria que a hidrólise no micro-ondas foi de elevada eficiência, evidenciando uma limitação do método de hidrólise ácida para a caracterização da batata. Outro argumento para a discrepância seria alguma falha humana na execução do experimento, talvez tenha ocorrido certa concentração do meio pela evaporação de água no aquecimento.

A subestimação da hidrólise ácida pode ter decorrido da degradação da glicose a hidroximetilfurfural, devido ao meio ácido somado à elevada temperatura da autoclave. Contudo, o problema da subestimação estar na hidrólise ácida é uma hipótese levantada, um estudo mais detalhado e comparativo com a hidrólise enzimática deveria ser conduzido, pois, viu-se que a AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) adotou a hidrólise enzimática como método para a determinação de amido.

Tal estudo mais detalhado demandaria um tempo razoável e não era prioridade de pesquisa no estágio inicial desta tese, mas sim a definição de um processo para a produção de etanol a partir da batata-doce. Na busca por uma maneira rápida de contornar a desconfiança sobre a hidrólise ácida, foi identificada uma relação linear entre a umidade na batata-doce e o teor de amido, e mais precisamente com o Teor de Açúcares Redutores Totais (ART). Na literatura não foi encontrado algum trabalho que já tenha identificado esta relação linear, então se viu a oportunidade de escrever um artigo sobre isto, no presente trabalho consiste no Capítulo 3. Portanto, este método alternativo passou a ser adotado para estimar o teor de ART nos estudos que são apresentados nos Capítulos 6 e 7. Após os estudos fermentativos, a hidrólise para a caracterização da batata passou a ser estudada em detalhes, o que deu origem ao Capítulo 4, onde se viu que foram investigadas a hidrólise ácida, enzimática e outros fatores, visando o aperfeiçoamento da técnica e esclarecer as dúvidas levantadas nos experimentos iniciais do trabalho.

5.6 Estudo 4: Método de pré-aquecimento da batata-doce

Após o Estudo 3, fez-se um cálculo preliminar de custos e 91% do custo total foi referente à levedura, isto considerando a CAT-1 (R\$/kg 146,18) na dose de 17,5 mg/g de batata. O segundo fator de maior impacto foi a energia de aquecimento no micro-ondas (2,83%) e o terceiro a matéria-prima (2,3%).

Embora no Estudo 3 o resultado da hidrólise tenha sido interessante, houve a desvantagem do prolongamento do tempo na etapa de redução de viscosidade. Então, objetivando a simplificação das etapas, redução dos custos com a levedura e com a energia de aquecimento, este quarto estudo foi planejado.

A dosagem da levedura foi reduzida para 3,33 mg/g de batata. O consumo energético foi reduzido com menos massa sendo submetida ao aquecimento, onde apenas a batata-doce foi aquecida, ou seja, sem a presença da água de diluição. O aquecimento da batata-

doce foi definido em teste preliminar onde na temperatura de 78°C foi sensorialmente percebido o início da cocção.

Já que a etapa de redução de viscosidade necessita de um tempo mais prolongado, seria interessante realizá-la simultaneamente com a fermentação, que também ocorre em um período mais longo.

Considerando os argumentos expostos, questionou-se: “No Estudo 1, no caso onde apenas a enzima GC 626 foi utilizada, seu desempenho não foi satisfatório, mas a temperatura de operação foi 60°C. Utilizando a batata-doce pré-aquecida a 78°C, onde amido está mais gelatinizado, isto favoreceria a hidrólise com a GC 626?” Pois, no caso positivo seria possível a simplificação das etapas, porque assim a levedura e enzimas empregadas possuem pH ótimo no mesmo intervalo. Desta forma, a metodologia experimental adotada neste estudo é apresentada na Figura 5.5, estabeleceu-se que o pH ficaria no valor 4 e adicionalmente foi testada a enzima de redução de viscosidade Optimash BG, realizou-se um experimento com a Optimash BG e outro sem.

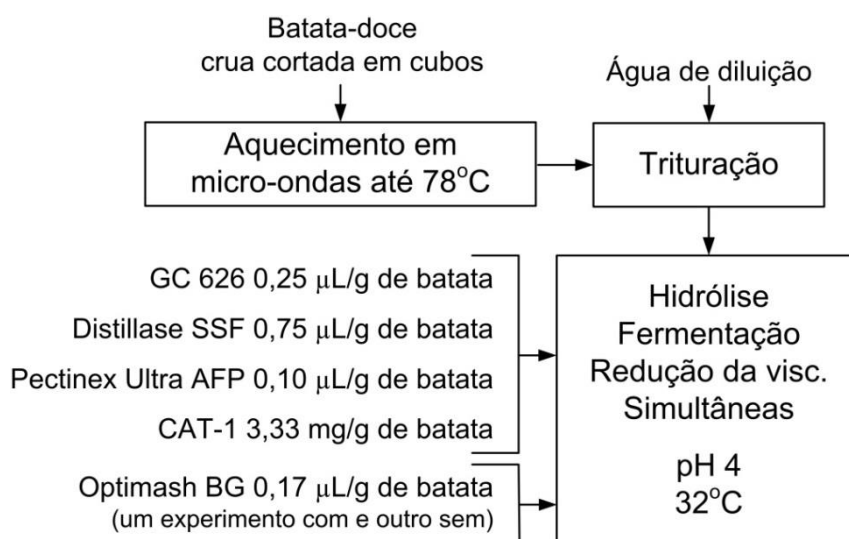


Figura 5.5: Metodologia experimental empregada no Estudo 4.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.4, Tabela 5.5 e Figura 5.6.

Com base nos resultados da caracterização da batata, o valor teórico máximo de etanol foi calculado como 11,28%, pode-se observar na Tabela 5.4 que alguns resultados atingiram este patamar, inclusive com a Optimash BG em 39,5 h e 46 h os resultados foram um pouco superiores, 11,83% e 11,47%, respectivamente.

Os resultados mostraram que inicialmente o processo foi mais rápido com a Optimash BG (até 22 h), mas quando foi observada a estabilização da fermentação não houve diferença significativa entre os resultados com e sem a Optimash BG (a partir de 39,5 h).

Ao final do processo, percebeu-se sensorialmente que o meio com Optimash BG era levemente menos viscoso do que o meio sem, mas é uma informação de caráter qualitativo, já que ainda não se dispunha de um viscosímetro para a medição das viscosidades.

Tabela 5.4: Resultados de produção de etanol, onde em um experimento houve a adição da Optimash BG e em outro não.

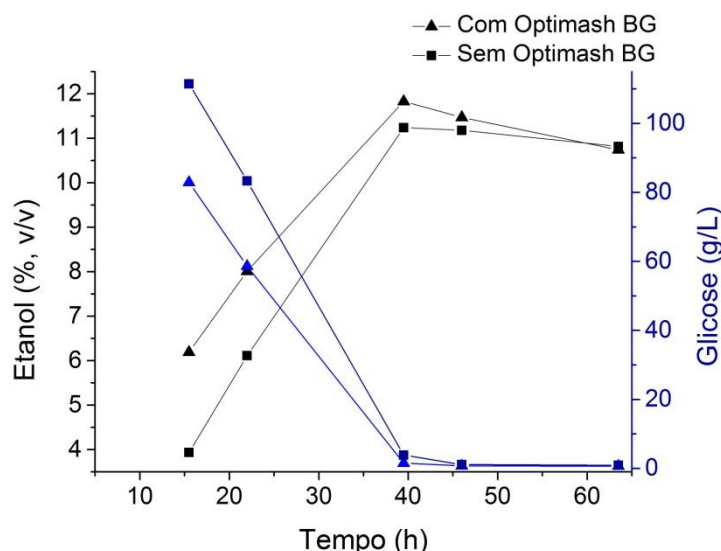
Tempo (h)	Com Optimash BG		Sem Optimash BG	
	Etanol ^a (% v/v)	Desvio Padrão	Etanol ^a (% v/v)	Desvio Padrão
15,5	6,19 ^C	0,55	3,94 ^D	0,13
22	8,01 ^B	0,30	6,11 ^C	0,25
39,5	11,83 ^A	0,20	11,24 ^A	0,13
46	11,47 ^A	0,75	11,18 ^A	0,74
63,5	10,74 ^A	0,11	10,82 ^A	0,36

^aAs médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, segundo o teste de Tukey com 95% de confiança.

Tabela 5.5: Resultados de glicose residual, onde em um experimento houve a adição da Optimash BG e em outro não.

Tempo (h)	Com Optimash BG		Sem Optimash BG	
	Glicose ^a (g/L)	Desvio Padrão	Glicose ^a (g/L)	Desvio Padrão
15,5	82,86 ^B	7,48	111,43 ^A	7,03
22	58,60 ^C	2,86	83,31 ^B	1,20
39,5	1,52 ^D	0,04	3,86 ^D	0,33
46	0,73 ^D	0,07	1,08 ^D	0,07
63,5	0,64 ^D	0,03	0,93 ^D	0,25

^aAs médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes, segundo o teste de Tukey com 95% de confiança.

**Figura 5.6:** Dados cinéticos do processo de hidrólise simultâneo com a fermentação.

Convém ressaltar que neste quarto estudo a fermentação foi mais lenta do que no segundo estudo, onde a estabilização das fermentações foram observadas em 39,5 h e 24 h (Experimento 1 do Estudo 2), respectivamente. A tal fato se atribui a maior razão à

redução da dose de levedura, pois, como pode ser visto na Tabela 5.5, em 22 h de fermentação ainda havia uma quantidade significativa de glicose no meio a ser convertida pela levedura. Observa-se que, inicialmente um meio menos viscoso favoreceu a levedura, pois em 15,5 h e 22 h o consumo de glicose foi maior para com a Optimash BG do que sem.

5.7 Considerações finais

Neste capítulo foram apresentados quatro estudos nos quais ocorreram uma série de modificações, visando o aumento de rendimentos, praticidade de operação e redução de custos.

Entre as estruturas de processo testadas, considerou-se a do Estudo 4 a mais promissora, devido aos seguintes diferenciais:

- Redução do consumo energético: com redução da massa submetida ao aquecimento e também devido à redução da temperatura (nos estudos anteriores a temperatura de referência era 85°C e no Estudo 4 passou a ser 78°C);
- Aquecimento prévio da batata, pois com uma batata-doce mais macia a etapa seguinte de trituração foi facilitada;
- Simplificação do processo, etapas ocorrendo simultaneamente: hidrólise, fermentação e redução da viscosidade.

Por tais razões o processo do Estudo 4 consistiu na base adotada nos estudos que seguiram nesta tese (Capítulos 6 e 7).

Uma desvantagem a comentar é que nos resultados do Estudo 4 a velocidade da fermentação foi mais lenta em relação ao Estudo 2, mas acreditou-se que com determinados aperfeiçoamentos tal questão poderia ser solucionada.

A partir dos estudos apresentados neste capítulo, foram definidos os seguintes pontos para os experimentos realizados posteriormente:

- Concentração da batata-doce no meio: 1,5:1 (kg:L);
- Concentração da Pectinex Ultra ALF: 0,1 µL/g de batata;
- A não utilização da enzima Optimash BG, pois a diferença que esta enzima causou no início do processo deixou de existir quando o tempo avançou.

Salienta-se que possíveis melhorias no processo poderiam fazer com que o emprego da Optimash causasse diferença significativa. Mas, de qualquer maneira, optou-se por não seguir o estudo com tal enzima, até porque acarretaria em custo adicional. Reconhece-se que há um campo interessante a ser explorado sobre esta questão de redução de viscosidade, mas não consistiu no foco desta tese.

Mesmo com a redução da dose da levedura de 17,5 para 3,33 mg/g de batata, seu custo ainda tinha elevada participação no custo total (65%). Pesquisou-se por uma

alternativa mais barata e foi encontrada a levedura Angel Thermal Resistance Alcohol, com o preço de R\$/kg 32,75 (recordando que o preço da CAT-1 era R\$/kg 146,18). Sendo assim, nos estudos que seguiram a levedura Angel Thermal Resistance Alcohol passou a ser usada no lugar da CAT-1, mas a concentração foi mantida fixa em 3,33 mg/g de batata.

Considerando que no processo adotado as enzimas GC 626 (0,25 μ L/g de batata) e a Distillase SSF (0,75 μ L/g de batata) passaram a ser adicionadas na mesma etapa, viu-se que seria interessante substituí-las pela Stargen 002, que é uma composição de α -amilase e glucoamilase. A Stargen 002 é uma mistura comercial da marca Genencor fabricada pela DuPont, onde o desenvolvimento da Stargen 002 foi direcionado para o mercado de hidrólise do amido granular. Outro ponto que levou à opção pela mudança à Stargen 002 foi que já era uma enzima que já vinha sendo utilizada nos estudos anteriores do GIMSCOP, com Masiero (2012) e Risso (2014). Portanto, a dose de Stargen 002 empregada na sequência dos experimentos foi de 1 μ L/g de batata, que é a soma das doses da GC 626 e da Distillase SSF, e também em equivalência é a mesma dose estabelecida por Risso (2014).

Estabelecidos os pontos abordados nesta seção, um estudo sistemático tinha de ser conduzido. O diferencial do aquecimento prévio havia de ser comprovado em um estudo comparativo com a batata-doce crua, ou seja, com o amido na forma granular (tema explorado no Capítulo 6). Também, o aquecimento prévio no micro-ondas deveria ser testado comparativamente com o aquecimento convencional, para então se constatar se o emprego do micro-ondas implicaria em algum ganho (tema explorado no Capítulo 7).

Também foi realizado um teste visando reduzir a temperatura de aquecimento prévio, tendo como critério a percepção sensorial do início do cozimento, a redução foi ligeira, de 78 °C para 76 °C, sendo então esta última temperatura fixada nos experimentos posteriores.

5.8 Referências

MASIERO, S. S. **Microusinas de etanol de batata-doce: viabilidade econômica e técnica**: Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012.

MINITAB Inc. **Minitab 17: Guia de introdução ao Minitab 17**, 2016.

RISSO, R. D. S. **Etanol de Batata-doce: Otimização do Pré-processamento da Matéria-prima e da Hidrólise Enzimática**. Porto Alegre: Dissertação de mestrado em engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2014.

SAIFUDDIN, N.; HUSSAIN, R. Microwave Assisted Bioethanol Production from Sago Starch by Co-Culturing of Ragi Tapai and *Saccharomyces Cerevisiae* **Journal of Mathematics and Statistics**, p. 198-206, 2011.

SCHWEINBERGER, C. M. *et al.* Estudo sobre a temperatura de liquefação e utilização de micro-ondas no processo de hidrólise do amido de batata-doce para a produção de

etanol, In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2014.

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

ZHANG, X. *et al.* Effect of microwave irradiation on the structure of glucoamylase. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2323-2328, 12// 2012. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511312003510> >.

ZHANG, X.-Y. *et al.* Effect of microwave irradiation on secondary structure of α -amylase by circular dichroism **J. Cent. South Univ. Technol.**, v. 18, p. 1029–1033, 2011.

Capítulo 6 – Improving the ethanol production from sweet potato

Abstract

In the energy context, bioethanol has received considerable attention. In relation to fossil fuels, bioethanol has the following advantages: it is not a net contributor to greenhouse gas, it does not have the toxic gasoline additives, and it is readily biodegradable. In the present work was studied the ethanol production from sweet potato. The starch hydrolysis was performed applying the commercial enzyme mixture Stargen 002, which was developed especially to degrade granular starch. Experiments were done in both conditions: sweet potato uncooked and cooked (at 76°C), comparing granular vs. gelatinized starch. In the experiment with cooked sweet potato the fermentation was stabilized in 24 h, with 9.25% (v.v⁻¹) of ethanol, at the same time, the concentration with uncooked sweet potato was 4.54% (v.v⁻¹). The process with cooked sweet potato was selected. The results obtained from a central composite design indicated that pH did not influence significantly. Temperature and time presented a significant effect and the processes showed to be more sensitive to temperature than time. The major contribution of the optimization was that the time could be reduced from 24 h to 18 – 19 h, allowing further greater turnover among bioreactors in a plant. In the proposed method, only sweet potato is preheated, which leads to energy savings by reducing the mass that is heated and also applying a temperature below the usual ones during liquefaction. Additionally, the hydrolysis, viscosity reduction and fermentation occurred all at the same time.

Keywords: Sweet potato, starch, ethanol production, reducing the fermentation time, process optimization.

6.1 Introduction

In the energy context, bioethanol has received considerable attention. Unlike fossil fuels, bioethanol is not a net contributor to greenhouse gas, since bioethanol is produced from renewable source, that is able to photosynthetically assimilate CO₂ produced during bioethanol production and combustion (Walker, 2011).

Other environmental and health benefits of bioethanol include: substitution of toxic gasoline additives such as methyl tertiary-butyl ether (MTBE) and lead; ethanol containing 35% of O₂ is an oxygenate that reduces harmful exhaust pipe emissions due to more complete fuel combustion; and ethanol is readily biodegradable. Nevertheless, the ethanol combustion can also produce in very small proportions formaldehyde (carcinogenic) and acetaldehyde, which is an ozone (pollutant in the air) precursor (Walker, 2011).

Given the favorable points to ethanol, currently there is a significant search for ethanol production from different raw starchy materials.

Starch is formed by two glucose polymers: amylose, which is linear, and amylopectin, which is branched. Starch is semi-crystalline in nature, with alternating layers of amorphous and crystalline regions. The crystallinity is exclusively associated with the amylopectin, while the amorphous regions are mainly represented by amylose. In the polycrystalline state, the polysaccharides are densely packed by hydrogen bonding (intra and inter molecular), providing resistance to chemical and enzymatic treatments (Singh *et al.*, 2003; Martín e López, 2009).

When starch granule is heated in excess of water, the water molecules become linked by hydrogen bonding to the exposed hydroxyl groups of amylose and amylopectin, then the crystalline structure is disrupted. This process causes the swelling and solubility. The starch granule can swell up to 30 - 100 times its original volume, depending on its botanical source. The described process consists on the starch gelatinization, which is defined as the collapse of crystalline order, manifesting irreversible changes, such as granule swelling, pasting, loss of optical birefringence, uncoiling and dissociation of the double helices, and starch solubility (Singh *et al.*, 2003). Therefore, when the starch is gelatinized it is more susceptible to hydrolysis (Martín e López, 2009; Srichuwong *et al.*, 2012). Most of ethanol producing from starchy raw materials is based on starch gelatinization.

The starch gelatinization temperature range varies widely, even within the same botanical species, because the cultivar type and growing conditions also influence (Singh *et al.*, 2003; Srichuwong *et al.*, 2012). However, to give an overview, the peak temperature in Differential Scanning Calorimeter (DSC) analysis can be between 52.2 – 78.8°C (Singh *et al.*, 2003). Abegunde *et al.* (2013) analyzed the gelatinization through DSC in eleven cultivars of sweet potatoes, and the average result was: onset transition temperature of 62.3 ± 5.6°C, peak transition temperature of 71.2 ± 5.2°C and conclusion transition temperature of 81.8 ± 2°C.

In ethanol production practice, is usually performed higher temperature (90 – 120°C) than starch gelatinizing range, to ensure the complete gelatinization (Srichuwong *et al.*, 2012).

Another way to break the starch down is the so-called cold hydrolysis, where temperatures are below that of the onset of gelatinization. Then, the hydrolytic enzymes act on starch in its native form. The main argument in favor of this technique is the energy saving (Robertson *et al.*, 2005).

To perform the cold hydrolysis are necessary enzymes able to digest the raw starch and those can be found even in the feedstock. Anyway, for ethanol production, it is recommended to increase the enzyme content, which can be done by adding enzymes produced by microorganisms (Robertson *et al.*, 2005).

There are a fair number of enzymes capable of raw starch degrade, and they have been reported since the 70s, in Robertson *et al.* (2005) are listed seventy-six enzymes or extracellular enzyme mixtures/systems. Since the granular starch is harder to hydrolyze, research has been made to improve the enzymes activity. In Wong *et al.* (2004), the gene coding for a barley α -amylase was cloned into a *Saccharomyces cerevisiae* and after an evolution procedure one mutant showed 1000 times the total activity and 20 times the specific activity of the wild-type enzyme.

In the present work was studied the ethanol production from sweet potato. First, the effect of cooking prior to hydrolysis was studied, by performing experiments with cooked and uncooked sweet potato, enabling the evaluation of performance on raw and gelatinized starch. After this comparative study, the cooked method, due to its best results, was further studied by a central composite experimental design to improve the fermentation conditions, the investigated variables were time, temperature and pH.

6.2 Materials and methods

Sweet potatoes used in the experiments were purchased at a local market in the city of Porto Alegre (Brazil), characterized by having peel and inner light cream-coloured (Figure 6.1).



Figure 6.1: Picture of sweet potato used in the experiments.

The sweet potatoes were manually cut into pieces of approximately 5 mm, without removing the peel.

The procedure used in the comparative study between sweet potato uncooked and cooked is presented in Figure 6.2.

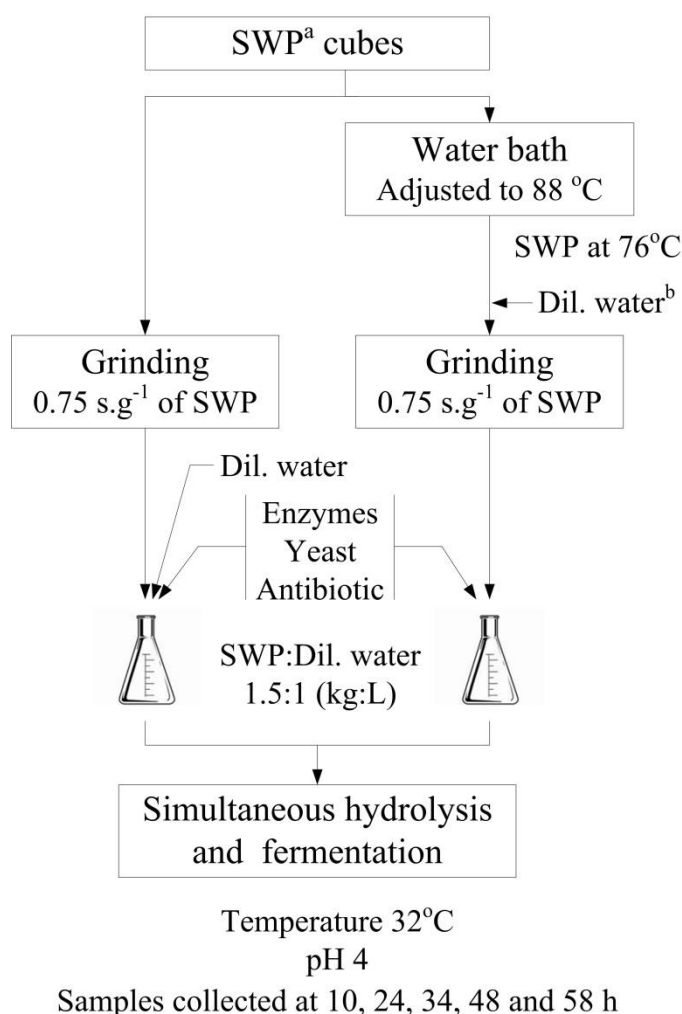


Figure 6.2: Layout of the procedure adopted in comparative study between raw and gelatinized starch.

^aSWP: Sweet potato

^bDil. water.: Dilution water

It can be noted in Figure 6.2 that the addition of the dilution water is done in different times. When raw sweet potato is first mixed before with dilution water, the subsequent division of the suspension to erlenmeyers flasks is complicated, because of suspension non-homogeneity. Therefore, it was better to put the exact amount of sweet potato in erlenmeyers flasks and later the dilution water. That difficulty does not occur when the sweet potato is cooked, because the result of grinding water together with sweet potato is more cohesive.

For the sweet potato grinding was used a domestic processor (500 W). The grinding time was set the same for both methods, as shown in Figure 6.2.

To keep the pH constant at 4 during the hydrolysis and fermentation, the system was buffered by addition of citric acid and sodium citrate in the dilution water.

In the cooking method, sweet potato cubes were placed in a beaker cup (without water, only the cubes), which was immersed in the water bath. The beaker was covered with aluminum paper to prevent moisture loss during heating.

The commercial enzyme mixture Stargen 002, produced by DuPont, was used to the hydrolysis. Stargen 002 contains an *Aspergillus kawachi* α -amylase expressed in *Trichoderma reesei* and a glucoamylase from *Trichoderma reesei*, and was developed to synergistically hydrolyze granular starch. The recommended dose of Stargen 002 is 0.7 – 1.4 $\mu\text{L.g}^{-1}$ of feedstock, under pH 3.3 – 4.5 and fermentation during 24 to 76 hours at 20 – 40°C (Genencor, 2009).

For the pectic substances degradation, contributing to viscosity reducing of the mash, was used the enzyme Pectinex Ultra AFP, produced by Novozymes from strains of *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger* (Novozymes, [s.d.]). The recommended dose of Pectinex Ultra AFP is 0.05 – 0.25 $\mu\text{L.g}^{-1}$ of feedstock, under optimum pH range from 3 – 4.2, being active in the pH range of 2.2 – 5, the product is active from 10 – 60°C (Novozymes, 2011).

Saccharomyces cerevisiae strain lyophilized Angel Thermal Resistance Alcohol (produced by Angel) was applied in the fermentation. According to the manufacturer, the yeast is tolerant until 42°C, the ethanol tolerance is until 17% (v.v⁻¹) and is capable to ferment even when pH is 2.5 (Angel, [s.d.]).

To prevent bacterial contamination the doxycycline antibiotic was used. The dosages per mass of sweet potato were: Stargen 002 1 $\mu\text{L.g}^{-1}$, Pectinex Ultra AFP 0.1 $\mu\text{L.g}^{-1}$, yeast Angel Thermal Resistance Alcohol 3.33 mg.g^{-1} and doxycycline 0.28 mg.g^{-1} .

The experiments were performed in quadruplicate in erlenmeyers flasks, which were incubated in an air shaker under orbital agitation of 175 rpm.

The ethanol production and glucose remaining were observed over 58 h of fermentation, where samples were collected at different times, as shown in Figure 6.2. The samples were centrifuged at 5241 g for 30 min and the supernatant was analyzed. The determination of sugars and ethanol was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) with Hi-Plex H Agilent column, with water as the mobile phase. The column temperature was 60°C, with Refractive Index detector, the mobile phase flow rate was 0.6 mL.min^{-1} , injected sample volume was 20 μL .

The theoretical potential for ethanol production was calculated by the following equation proposed by Schweinberger *et al.* (2015):

$$x_{ETH,Theor}(\%, v. v^{-1}) = \frac{9200(-0.01121x_{MST}+1.05412)x_{SWP}}{142.02+1.4202x_{MST}x_{SWP}+77.8(-0.01121x_{MST}+1.05412)x_{SWP}} \quad (6.1)$$

The ethanol yield potential ($x_{ETH,Theor}$) is calculated as a function of sweet potato moisture (x_{MST} [%]) and amount of potato added (x_{SWP} [kg]) in relation to the volume of dilution water, which was fixed in one liter, i.e., x_{SWP} [kg]: 1 L of dilution water. Therefore, in the present work, the x_{SWP} value is 1.5 kg (shown in Figure 6.2). Equation

(6.1) was deducted for an ideal condition, where it is assumed that starch is completely hydrolyzed, and all sugars are converted into ethanol.

For sweet potato moisture determination, three samples were analyzed thermogravimetrically (kilo at 105°C). Having the ethanol values, both experimental ($x_{ETH,Exp}$) and theoretical ($x_{ETH,Theor}$), the efficiency of conversion (ε_{CONV}) was calculated according to the Eq. (6.2).

$$\varepsilon_{CONV}(\%) = 100 \frac{x_{ETH,Exp}(\%,v.v^{-1})}{x_{ETH,Theor}(\%,v.v^{-1})} \quad (6.2)$$

After the comparative study between the cooked and uncooked sweet potato, the cooked method, due to its best results, was further studied by a central composite experimental design to improve the fermentation conditions, the investigated variables were time, temperature and pH. The design details are presented in Results section.

The Minitab software was used for the central composite design construction and for results analysis, i.e., Tukey's test for comparison of means, models estimation, and optimization of operational conditions.

6.3 Results

In the comparative experiment, sweet potatoes had 68.63% of moisture content, resulting in a theoretical ethanol potential of 12.23%. Figure 6.3 shows a comparison between the sweet potato mashes.



Figure 6.3: Pictures of two erlenmeyers at zero time and after 24h of fermentation.

Ethanol and glucose experimental results are presented in Figure 6.4, and Table 6.1 shows results concerning conversion efficiencies.

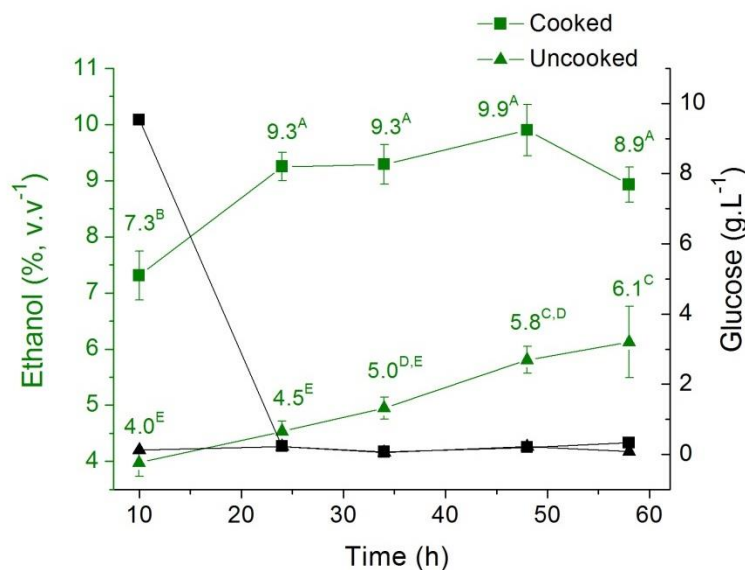


Figure 6.4: Kinetic data upon simultaneous hydrolysis and fermentation process.

*The means that do not share the same letter are significantly different, according to the Tukey test with 95% of confidence.

Table 6.1: Comparative results between sweet potato uncooked and cooked, concerning conversion efficiencies: ε_{CONV} (%).

Time (h)	Uncooked	Cooked
10	32.55	59.79
24	37.13	75.65
34	40.48	75.98
48	47.52	80.97
58	53.16	73.03

For uncooked sweet potato, Figure 6.4 shows that glucose content is near to zero whereas is observed a continuous ethanol increasing, because hydrolysis was simultaneous with Fermentation. So, as glucose was released from starch it was readily consumed by the yeast, for this reason is not observed glucose increasing in the medium. For preheated sweet potato, hydrolysis was also simultaneous with fermentation. But, due to preheating process, starch became more susceptible to hydrolysis, for this reason during the first hours there was a significantly glucose content, which soon after decreased to almost zero.

As can be seen in Figure 6.4, in the process where sweet potato was cooked the fermentation was already stable in 24 hours. In this case, the exact point where fermentation process ends could not be found, it was between 10 – 24 h, requiring additional experiments to define it more precisely.

In contrast, with uncooked sweet potato there was a gradual ethanol increase and even at 58 h the ethanol content was lower than that obtained with cooked sweet potato. For comparison, with uncooked sweet potato the ethanol content at 58 h was 6.13% (v.v⁻¹), whereas for cooked sweet potato the result at 24 h was 9.25% (v.v⁻¹), i.e., 51% higher.

With these results, it can be concluded that even if Stargen 002 has been developed to act on granular starch, the performance in hydrolysis is substantially higher when starch is gelatinized.

The process with cooked sweet potato was selected to continue the research, because even consuming a little more energy than raw sweet potato, the consumption is not as high when compared to traditional processes, pointing out that in the present case the potatoes are heated only up to 76°C.

In addition, although raw sweet potato implies in less energy consumption, it demands a larger number of bioreactors, since the fermentation time is higher. Therefore, the production cost is lower, but the investment cost is potentially high.

In the literature there are some studies about ethanol production from sweet potato (Cao *et al.*, 2011; Srichuwong *et al.*, 2012; Dewan *et al.*, 2013; Duvernay, Chinn e Yencho, 2013; Lareo *et al.*, 2013). One of the contributions in the present study, compared to others, is the proposal of sweet potato preheating. Besides the starch gelatinization, the preheating softens sweet potato, facilitating subsequent grinding process, it is worth to mention because the raw sweet potato is quite tough. Additionally, it seems that when starch is gelatinized the grinding process becomes it more fragile to hydrolysis.

Among the cited works, it is interesting to talk about the studies of Zhang *et al.* (2011) and Srichuwong *et al.* (2012). Both authors worked under Very High Gravity (VHG) fermentation, where the ethanol content in the final broth is usually between 15-17% (v.v⁻¹) (Puligundla *et al.*, 2011).

However, there is some limitation in the VHG fermentation when using root and tuber mashes, resulting from their highly viscous nature (Cao *et al.*, 2011). When the mash is prepared, besides the compound of interest, which is the starch, others sweet potato components are also present. The cell wall constituents are responsible for the high viscosity of fermented mash. So, to overcome this difficulty, are also used enzymes that degrade cellulose, hemicellulose and pectic substances.

In Zhang *et al.* (2011), the raw sweet potato was grinded, and then the dilution water and an α -amylase were added, the liquefaction was carried out at 85°C during 20 min. After the liquefaction process, when sweet potato mash was cooled to room temperature (30°C) the yeast, glucoamylase and xylanase (which is a hemicellulose disintegrating enzyme) were added, so the process adopted was the called Saccharification Simultaneously with Fermentation (SSF), which was carried out together with the viscosity reduction. In laboratorial scale, after 27 h of fermentation, Zhang *et al.* (2011) obtained the ethanol production of 16.29 % (v.v⁻¹).

In Srichuwong *et al.* (2012), a developed sweet potato (K159) was compared with an ordinary type (DCY). The gelatinization temperature (49.5 – 66.2°C) of isolated K159 starch was approximately 20°C lower than that of DCY starch (70.9 – 85.4°C). The lower gelatinization temperature of K159 starch was attributed to the higher proportion of short amylopectin branch-chains. The first step was the viscosity reducing of a raw sweet potato suspension, applying a mixture of enzymes active upon pectic substances, hemicellulose and cellulose. This step was performed at 50°C for 3 h. Then, the liquefaction and subsequent SSF was done. The results showed that liquefaction at 60°C

was sufficient to provide a satisfactory result with K159, and in the SSF process the ethanol yields of 15.1 – 15.5 % (v.v⁻¹) were obtained during 48 h of fermentation. In contrast, DCY mash required higher liquefaction temperature (90°C) to achieve the similar ethanol yield.

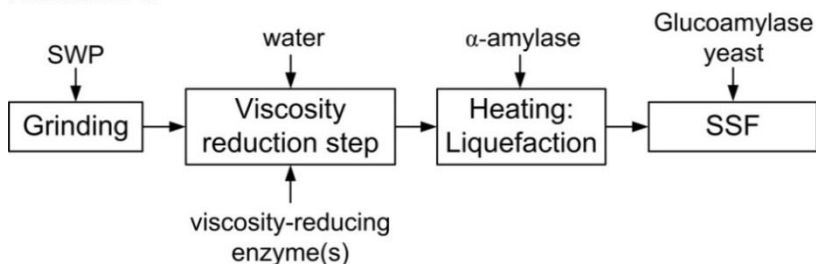
In the present methodology, only sweet potatoes receive heat in the heating step, different from that is typically seen in other methodologies, where the heating step occurs in liquefaction and the dilution water is also present, so the mass is larger demanding more energy.

Not using a special sweet potato as K159, the liquefaction temperature usually is around 85 – 90°C. In the present work, the sweet potato was heated only to 76°C, possibility due to employment of Stargen 002.

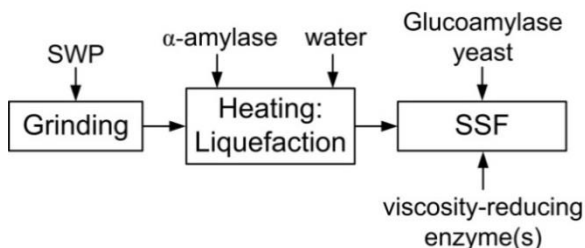
In the proposed methodology the liquefaction did not occur separated from the saccharification (Stargen 002 is a mix of both enzymes: α -amylase and glucoamylase), then the completely Hydrolysis is Simultaneous with Fermentation (HSF). Moreover, the enzyme addition to reduce the viscosity takes place at the same time, being all one step, as can be seen in Figure 6.5, which presents a comparison between the present methodology and the found in literature.

Processes in the literature

Alternative 1:



Alternative 2:



Present study

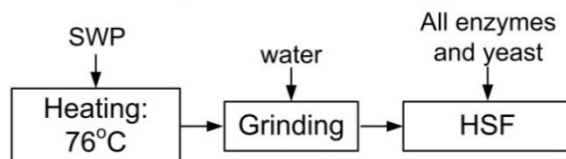


Figure 6.5: Comparison between the methodologies of literature and the present study.

Since cooked sweet potato was selected to continue the study, a central composite design was employed to improve the fermentation conditions. Table 6.2 shows the variables and its limits.

Table 6.2: Factors and variations to the central composite design.

Factor	Lower limit	Central point	Upper limit
Temperature (°C)	28	35	42
pH	3.5	4	4.5
Time (h)	14	18	22

The sweet potatoes used in these experiments were purchased at two different times. The sweet potatoes bought at first were processed and fermented soon after, and then all experiments at 28°C were conducted. With the sweet potatoes bought in the second time the media were prepared for all other experiments and the erlenmeyers were frozen. To perform this experiments the media were thawed inside of the refrigerator (~3°C). And then, bringing the media the experiment condition, the enzymes and the yeast were added.

The sweet potato bought at first had 76.45% of moisture, leading to 8.3% of theoretical ethanol potential. The sweet potatoes purchased at the second time had 69.59% of moisture, with 11.74% of theoretical ethanol potential. Although sweet potatoes had different ethanol potential, such difference is relativized by adopting ε_{CONV} as response variable. Table 6.3 shows the experimental results and Table 6.4 the corresponding models (i.e., response surface) for ε_{CONV} .

Table 6.3: The results of the central composite experiment design. The efficiencies above 90% are highlighted.

Exp.	Temperature (°C)	pH	Time (h)	Glucose ^a (g.L ⁻¹)	$x_{ETH,Exp}$ (% v.v ⁻¹)	$x_{ETH,Theor}$ (% v.v ⁻¹)	ε_{CONV} (%)
1	28	3.5	14	0.15	6.10	8.3	73.44
2	28	3.5	14	0.15	6.11	8.3	73.62
3	28	3.5	22	0.09	5.92	8.3	71.35
4	28	3.5	22	0.12	6.14	8.3	73.97
5	28	4	18	0.11	5.92	8.3	71.38
6	28	4.5	14	0.27	5.87	8.3	70.68
7	28	4.5	14	0.29	5.91	8.3	71.22
8	28	4.5	22	0.25	6.71	8.3	80.80
9	28	4.5	22	0.34	6.41	8.3	77.24
10	35	4	14	11.10	9.96	11.74	84.83
11	35	4	22	0.59	10.36	11.74	88.21
12	35	4	18	0.83	10.94	11.74	93.19
13	35	4	18	0.83	11.36	11.74	96.74
14	35	4	18	0.80	10.96	11.74	93.32
15	35	4	18	0.82	11.22	11.74	95.55
16	35	4	18	0.86	11.29	11.74	96.15
17	35	4	18	0.86	11.11	11.74	94.66
18	35	3.5	18	0.79	10.59	11.74	90.21
19	35	4.5	18	0.95	10.98	11.74	93.55

Table 6.3 (continuation): The results of the central composite experiment design. The efficiencies above 90% are highlighted.

Exp.	Temperature (°C)	pH	Time (h)	Glucose ^a (g.L ⁻¹)	$x_{ETH,Exp}$ (% v.v ⁻¹)	$x_{ETH,Theor}$ (% v.v ⁻¹)	ε_{CONV} (%)
20	42	3.5	14	102.60	2.69	11.74	22.94
21	42	3.5	14	83.74	4.17	11.74	35.52
22	42	3.5	22	88.29	4.00	11.74	34.08
23	42	3.5	22	55.13	6.73	11.74	57.34
24	42	4	18	88.46	4.66	11.74	39.68
25	42	4.5	14	129.14	2.91	11.74	24.82
26	42	4.5	14	124.43	2.76	11.74	23.53
27	42	4.5	22	82.46	3.98	11.74	33.86
28	42	4.5	22	84.83	3.79	11.74	32.24

^aConcentration at end of fermentation

Table 6.4: Models construction and optimization, having ε_{CONV} as variable predicted.

Modeling				
Model terms	Model 1		Model 2	
	Coefficient	p	Coefficient	p
Constant	-8.269	0	-8.152	0
Temperature	0.500	0	0.486	0
pH	0.069	0.949	-	-
Time	0.087	0.296	0.118	0.003
Temperature ²	-0.007	0	-0.008	0
pH ²	0.020	0.886	-	-
Time ²	-0.003	0.157	-0.004	0.001
Temperature×pH	-0.008	0.068	-	-
Temperature×Time	0.001	0.118	0.001	0.017
pH×Time	0.001	0.905	-	-
R ² (adj)	95.42		98.93	
R ² (pred)	91.13		98.27	
Optimal point				
Temperature (°C)	33.37		32.95	
pH	3.5		-	
Time (h)	19.25		18.67	
ε_{CONV} (%)	97.95		97.13	

It is interesting to comment about the low efficiency presented at 42°C with high amount of residual glucose shown in Table 6.3, indicating that the problem has not occurred in the hydrolysis, but in the fermentation, because the yeast was not able to assimilate that amount of glucose residual, so the temperature negatively influenced the fermentation. The yeast used in the experiments was selected to tolerate higher fermentation temperatures (*"Angel Thermal Resistance Alcohol"*), and according to the

manufacturer, it is active until 42°C. Nevertheless, despite remaining active, it was observed that is not advantageous to work at that temperature due to the poor performance.

Efficiencies at 28°C were already significantly higher than at 42°C, but the best results were at 35°C. It can be seen that the 28°C did not affect yeast performance, since glucose residual is low, then one may conclude that temperature is this unfavorable for the hydrolysis, i. e., the yeast did not produce more ethanol because there was not enough glucose.

To obtain good results it is necessary that temperature favors both the hydrolysis as fermentation, in the experiments this compromise was better achieved at 35°C, where $\varepsilon_{CONV} > 90\%$ (at 18 h).

In Table 6.4 the “p” value is the probability of hypothesis that the coefficient is equal to zero. The optimization was done to maximize the conversion efficiency (ε_{CONV} (%)).

Model 1 was built with all experimental points presented in Table 6.3. Model 2 considers both variables, temperature and time, since they present influential effect in the model 1, but the conversion efficiency is much more sensitive to temperature than the time, as can be seen in Figure 6.6.

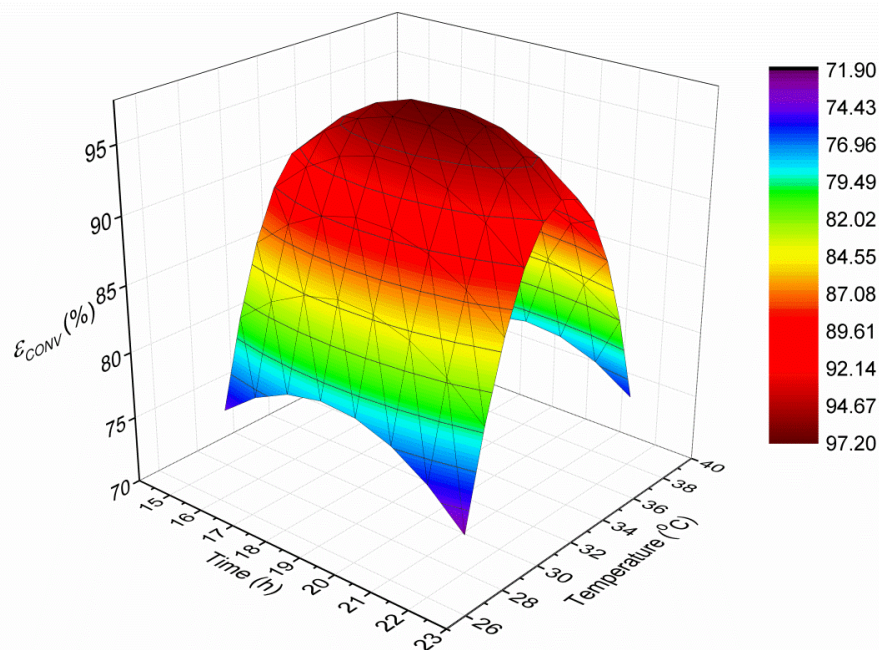


Figure 6.6: Model 2 plot: conversion efficiency as a function of time and temperature.

With the optimization results, it was seen that the temperature previously used (32°C) was already in the optimal region. But, concerning the fermentation time, it can be reduced from 24 h to 18 – 19h, which is a valuable information, because on a daily production it allows a greater turnover among bioreactors, thus requiring fewer number of these equipment and so, lower investment cost.

The results obtained in this study were very important to point out directions to a better methodology, highlighting that there are remaining factors to be studied, especially upon the optimal point. It should be carried out experiments with different sweet potatoes to verify the reproducibility. Another factor to investigate is whether the freezing exerts any effect on the results, because in the second batch of central composite design the sweet potato mashes undergone freezing process.

The sweet potatoes used in the experiments were acquired without the knowledge of how much time has passed since the harvest. So, it may be another important factor to investigate. The sweet potato has amylases naturally occurring, which over time can increase their activities (Zhang, Wheatley e Corke, 2002). Perhaps the action of those amylases together with Stargen 002 may significantly enhance the efficiency of conversion.

It is seen in Table 6.3 that the highest ethanol content achieved was 11.36% (v.v⁻¹) (Exp. 13), which is a value reasonably lower than the already reported in the literature upon fermentations with sweet potatoes, Zhang *et al.* (2011) and Srichuwong *et al.* (2012) obtained the ethanol production ~ 16% (v.v⁻¹).

According to Zhang *et al.* (2011), each 100 ml of reaction mixture contained approximate 60 – 80 g of sweet potato, which is a fairly high variation, assuming the sweet potato density as 0.978 kg.L⁻¹ (Oluwo, Khan e Salami, 2013) that is equivalent to the following dilutions: 1.55:1 – 4.39:1 (kg:L). Sweet potatoes used in that experiments had the moisture of 61.5%, applying Eq. (6.1) to estimate the theoretical ethanol potential the result is 16.18 – 22.66% for the two possible sweet potato concentrations. In laboratorial scale, after 27h of fermentation, Zhang *et al.* (2011) obtained the ethanol production of 16.29 % (v.v⁻¹).

According to Srichuwong *et al.* (2012) the mash to fermentation had the solids concentration of 0.33 – 0.37 kg.L⁻¹, the method used to determine this concentration was not mentioned. Then, based on other data provided in the paper, the sweet potato concentration was estimated at 1.17:1 (kg:L). Sweet potatoes used in those experiments had the moisture of 59.5%, applying Eq. (6.1) to estimate the theoretical ethanol potential the result is 15.09%. After 48h of fermentation, Srichuwong *et al.* (2012) obtained the mean ethanol production of 15.3 % (v.v⁻¹) (when using the sweet potato cultivar K159).

Zhang *et al.* (2011) and Srichuwong *et al.* (2012) reached higher ethanol concentrations because they worked with higher theoretical ethanol potentials, mainly due to the employment of drier sweet potatoes.

Therefore, it would be interesting carry out experiments applying the operation conditions established in the present study and increasing the theoretical ethanol potential, to see if an ethanol production in the order of 16% is also achievable.

6.4 Conclusion

Although the development of Stargen 002 enzyme mixture has focused in processing granular starch, it was found that the performance is more pronounced when the starch

is previously gelatinized.

Besides the starch gelatinization, the preheating softens sweet potato, facilitating subsequent grinding process. It seems that the mechanical process after starch gelatinization becomes it weaker to hydrolysis.

In the proposed method, only sweet potato is preheated, which leads to energy savings by reducing the mass and being at a temperature below those usually practiced in liquefaction. Besides, in the method, the hydrolysis, fermentation and viscosity reduction occurs at same time, being more interesting for practical applications.

In the experiments of central composite design was found that pH did not influence significantly, but temperature and time did, and the results were more sensitive to temperature than fermentation time.

The major contribution of the optimization was that HSF time can be reduced from 24 h to 18 – 19h, allowing greater turnover among bioreactors, thus requiring fewer number of fermenters and therefore, lower investment cost.

Although the results obtained in this study were positive, it is important to emphasize that there are still other factors to be investigated. Such as, the repetition at optimum point with different sweet potatoes, the evaluating of the effect of freezing upon the medium, the study of conversion efficiency over ripening sweet potato and the increase of theoretical ethanol potential (by increasing the concentration of sweet potato or by using a drier cultivar).

6.5 References

ABEGUNDE, O. K. *et al.* Physicochemical characterization of sweet potato starches popularly used in Chinese starch industry. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 169-177, 12// 2013. ISSN 0268-005X. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13000878> >.

ANGEL. **Angel Thermal Resistance Alcohol Active Dry Yeast**. Hubei, China: ANGEL YEAST CO., LTD. [s.d.].

CAO, Y. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato powder for the production of ethanol under conditions of very high gravity. **Front Chem Sci Eng**, v. 5, n. 3, p. 318-324, 2011.

DEWAN, A. *et al.* Saccharification and Fermentation of Waste Sweet Potato for Bioethanol Production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 6, p. 739-747, 2013. ISSN 1745-4530. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1111/jfpe.12042> >.

DUVERNAY, W. H.; CHINN, M. S.; YENCHO, G. C. Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Ind Crop Prod**, v. 42, p. 527-537, 2013.

GENENCOR. **STARGEN™ 002. Granular Starch Hydrolyzing Enzyme for Ethanol Production.** Danisco US Inc., 2009.

LAREO, C. *et al.* Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 493, 2013. ISSN 2193-1801. Available in: < <http://www.springerplus.com/content/2/1/493> >.

MARTÍN, J. C.; LÓPEZ, E. Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa. **Revista colombiana de química**. 38(3): 395-408 p. 2009.

NOVOZYMES. **Pectinex® Ultra AFP.** Application Sheet. Novozymes Switzerland AG, 2011.

_____. **Pectinex® Ultra AFP.** Product Data Sheet. Novozymes, [s.d.].

OLUWO, A. A.; KHAN, R. M.; SALAMI, M. J. E. Effect of tuber skin on the thermal properties of whole tubers of potato and sweet potato. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 2013.

PULIGUNDLA, P. *et al.* Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011. Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80052475026&partnerID=40&md5=923b7b7ea611c97112d796407a11bef9> >.

ROBERTSON, G. H. *et al.* Native or Raw Starch Digestion: A Key Step in Energy Efficient Biorefining of Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 353-365, 2006/01/01 2005. ISSN 0021-8561. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf051883m> >. Acesso em: 2014/11/25.

SCHWEINBERGER, C. M. **Inovação e Otimização no Processo de Produção de Etanol a Partir de Batata-doce.** Porto Alegre: Qualifying Project for PhD Thesis in Chemical Engineering, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 2015.

SINGH, N. *et al.* Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 5// 2003. ISSN 0308-8146. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814602004168> >.

SRICHUWONG, S. *et al.* Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 120-127, 2012. Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84857791562&partnerID=40&md5=f9a48974cef716e947fe10f1e8c54bb3> >.

WALKER, G. M. 125th Anniversary Review: Fuel Alcohol: Current Production and Future Challenges. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 1, p. 3-22, 2011. ISSN 2050-0416. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00438.x> >.

WONG, D. W. S. *et al.* High-Activity Barley \bold\alpha-Amylase by Directed Evolution. **The Protein Journal**, v. 23, n. 7, p. 453-460, 2004/10/01 2004. ISSN 1572-3887. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-004-5221-2> >.

ZHANG, L. *et al.* Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4573-4579, 2011. ISSN 09608524 (ISSN). Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79551690009&partnerID=40&md5=1e8e3fa41ed909deb3a4c9add3e2a7d3> >.

ZHANG, Z.; WHEATLEY, C. C.; CORKE, H. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 3, p. 317-325, 4// 2002. ISSN 0925-5214. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521401001491> >.

Capítulo 7 – Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods and cost analysis

Abstract

Currently, biomass contributes to ~14 % of global energy needs. Therefore, many studies and policies have been developed in order to expand the participation of renewable energy in the global energy matrix. In this context, ethanol has received substantial interest. This work investigates ways to improve efficiency in ethanol production from sweet potatoes, considering the costs that make the process potentially implementable. The following aspects were investigated: (i) conversion efficiency according to the post-harvest time; (ii) influence of the heating method (water bath (conventional) and microwave) as well as the corresponding processing costs. The conversion efficiency increased significantly during sweet potato ripening, where the highest value was achieved 25 days after harvest. This is a very important result since it has a strong impact on the final cost. Among the heating methods, the conventional one was slightly superior in terms of conversion efficiency (9 % higher at 25 days) and also had better results regarding cost analysis. Among four designed scenarios, the largest cost difference was 17.5 %. Instead of a definitive elimination of microwave heating, the results should be analyzed to identify where the microwave heating should be improved in order to make it more attractive in the future.

Keywords: Ethanol from sweet potato, conversion efficiency, ripening, microwave, costs analysis.

Artigo publicado no Canadian Journal of Chemical Engineering:

SCHWEINBERGER, C. M. *et al.* Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods, and cost analysis. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 94, n. 4, p. 716-724, 2016. ISSN 1939-019X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.22441> >.

7.1 Introduction

Petroleum, natural gas, and coal together contribute nearly 82 % of the global energy supply. Next comes biomass, making up ~14 % of the total. Many studies and policies have been developed in order to expand the participation of renewable energy in the global energy matrix. Bioethanol has received substantial attention, and from 2004 to 2010 its world production expansively increased by 77 % (Gupta and Verma, 2015).

The United States and Brazil are the main bioethanol producers. In 2013, the United States accounted for 57.68 % of the total volume produced, and Brazil, 29.24 % (Gupta and Verma, 2015).

Although Brazil has a prominent position in ethanol production, this production is concentrated in certain regions. The present study had its origin in a project of the GIMSCOP group. The project was planned in 2010, aiming to propose feedstock and process conditions that make ethanol production feasible in the Brazilian State Rio Grande do Sul.

Ethanol production in Rio Grande do Sul (RS) is very far from the demand. Automobile ethanol consumption in 2013 totalled 883 million litres, in a state which does not produce more than 8 million litres per year (UNICA, 2015). This occurs because only about 1.5 % of the total area for cropping is suitable for the traditional feedstock, i.e. sugarcane (Masiero, 2012). To change these conditions, at least one alternative feedstock is required, which was how the research began in GIMSCOP with Masiero (2012).

Masiero (2012) studied the feasibility of a micro-plant (capacity of 1000 L/day) involving four feedstocks: sugarcane, sweet sorghum, cassava, and sweet potato. Her research provided theoretical data of agricultural productivity (t/m^2), sugar concentration, starch concentration in starchy feedstocks, and costs. After analyzing the 3 financial indicators net present value (NPV), internal rate of return (IRR), and payback time and considering the average productivity of those feedstocks in RS, Masiero (2012) concluded that sweet sorghum and sweet potato were the most viable feedstocks.

As the production process with sweet sorghum is more established, the sweet potato was chosen for the experimental study, with the aim of making feasible what was found theoretically.

Since Masiero (2012), other studies have been done by Risso (2014) and by the present authors (Schweinberger, 2015). In these studies several improvements have been achieved, such as increasing of substrate concentration and ethanol content; decreasing of enzyme dosage and energy consumption; and changes in the process, making it more practical.

The starch-based ethanol industry has been commercially viable for about 30 years. During this time, many improvements have been made (Vohra *et al.*, 2014), such as for yeast (Inokuma *et al.*, 2014; Vohra *et al.*, 2014), enzymes (Robertson *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2014), feedstock (Saha and Ramachandran, 2013; Vohra *et al.*, 2014), or in the process (Cardona and Sánchez, 2007; Todri *et al.*, 2014; Palacios-Bereche *et al.*, 2015). This paper focuses on the process, using sweet potato as feedstock. Two aspects were investigated, regarding their influence on conversion efficiency: (i) effect of post-harvest time,

considering the amylases action; and (ii) comparison of two heating methods, the microwave and the conventional method.

Sweet potatoes synthesize amylases, so these naturally-present enzymes can be used to improve hydrolysis. Zhang *et al.* studied the α -amylase activity in six sweet potatoes during storage. The activity was lower at harvest, increasing to their highest levels around 60 days later (one cultivar had its peak around 125 days). After this peak, α -amylase activity gradually decreased (Zhang, Wheatley and Corke, 2002).

Starch contains a large number of hydroxyl groups, which specifically bind to water during heat treatment and which induce gelatinization. Due to water having a high dielectric constant, it accelerates gelatinization in a microwave field and helps unwind the chain structure of starch (Palav and Seetharaman, 2007; Fan *et al.*, 2013a). Microwave heating works through alternating electric and magnetic fields and induces a micro-movement of polar molecules trying to orient themselves to the electric field. Molecules rotate up to billions of times per second, leading to intermolecular friction, collision, and vibration, which are quickly converted into heat (Palav and Seetharaman, 2006; Fan *et al.*, 2013b).

Considering these described issues concerning the action of amylases over time and the effect of microwaves on starch, this study tested the hypothesis that they positively influence the conversion efficiency of sweet potato starch into ethanol. Assays with conventional heating were made for comparison.

Although an efficiency gain is very important, other factors should also be considered to verify whether the process has financial viability. In this study, the process costs were also analyzed in order to evaluate its viability.

7.2 Materials and methods

The sweet potatoes used in the experiments were purchased at a local market in the city of Porto Alegre (Brazil). They are characterized by having bark and an inner light cream colour (Figure 7.1).



Figure 7.1: Sweet potato used in the experiments.

For simultaneous hydrolysis and fermentation (SHF), the methodology was based on previous research from the present authors (Schweinberger, 2015). Through a central composite design, it was possible to conclude that the optimal conditions were around 19 h of SHF at 33 – 35 °C. Therefore, the conditions adopted in this work were 19 h and 34 °C. Additionally, it is of note that in the previous study the preheating was done only with a water bath, whereas the present work included microwave heating. The procedure used in the comparative study is shown in Figure 7.2.

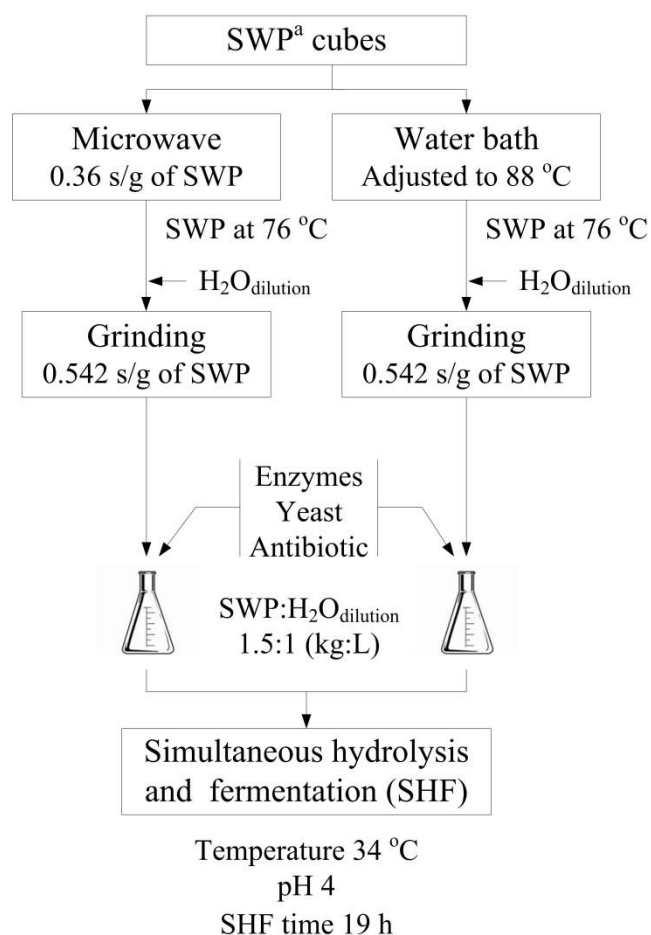


Figure 7.2: Layout of the procedure adopted in the comparative study between conventional and microwave heating. ^aSWP: Sweet Potato.

The experiments described in Figure 7.2 were repeated six times over six weeks when the postharvest time was: 4, 11, 18, 25, 32, and 39 days.

The sweet potatoes were manually cut into pieces of approximately 5 mm, without removing the bark.

In the experiments, a domestic microwave oven was used (1400 W, 2450 MHz), and for grinding a domestic processor was used (500 W).

For conventional heating, sweet potato cubes were placed in an aluminum receptacle (without water, only cubes), which was immersed in the water bath. The receptacle was covered with aluminum foil to prevent moisture loss during heating. The water bath was first heated to 88 °C, and when the temperature stabilized the receptacle with sweet

102 Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods and cost analysis

potatoes was added. The temperature of the sweet potatoes was monitored with a thermometer and they were removed when they reached 76 °C. The heating time of sweet potatoes was ~55 min/kg.

For microwave heating, a plastic casserole dish was used, which had a cover with perforations. In the first two weeks, the experiments were done using this cover, but it resulted in significant mass loss (0.19 kg/kg) due to moisture loss. Therefore, in the later experiments, the previous cover was replaced by a wrapping of PVC plastic film, after which mass loss was reduced to 0.0273 kg/kg.

To keep the pH constant at 4 during hydrolysis and fermentation, the system was buffered by adding citric acid and sodium citrate in the dilution water.

The commercial enzyme mixture Stargen 002 (DuPont) was used for hydrolysis. Stargen 002 contains an *Aspergillus kawachi* α -amylase expressed in *Trichoderma reesei* and a glucoamylase from *Trichoderma reesei* (Genencor, 2009). For the pectic substances degradation, which reduces viscosity of the mash, the enzyme Pectinex Ultra AFP was used, which is produced by Novozymes from strains of *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger* (Novozymes, 2009).

The *Saccharomyces cerevisiae* strain Angel Thermal Resistance Alcohol, produced by Angel, was used in the fermentation (Angel, 2015). To prevent bacterial contamination, a doxycycline antibiotic was used.

The dosages per mass of sweet potato were: Stargen 002 1 μ L/g, Pectinex Ultra AFP 0.1 μ L/g, yeast Angel Thermal Resistance Alcohol 3.33 mg/g, and doxycycline 0.28 mg/g.

The experiments were performed in Erlenmeyer flasks, which were incubated in an air shaker under orbital agitation of 175 rpm. Until 18 days after harvest, the experiments were done in quadruplicate, but some sweet potatoes began to rot and had to be discarded. Therefore, at 25 and 32 days the experiments were done in triplicate, and in duplicate at 39 days.

Ethanol production was quantified after 19 h of SHF. The samples were centrifuged at 5241 g for 30 min and the ethanol content in the supernatant was analyzed. The determination was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) with the Hi-Plex H Agilent column, with water as the mobile phase. The column temperature was 60 °C, the detector used was RID (refractive index detector), the mobile phase flow rate was 0.6 mL/min, and injected sample volume was 20 μ L.

Because each experimental condition was carried out with repetitions, each experimental condition obtained a group of results. The Tukey method was applied, testing the hypothesis of means equality of the different groups (Toutenburg, 2002). This comparison was done using Minitab software, considering 95 % confidence. The results of this test are expressed by adding letters to the mean values, indicating that mean values which do not share the same letter are significantly different.

The theoretical potential for ethanol production was calculated using Equation (7.1). This is a method proposed by the present authors in a previous study (Schweinberger, 2015), where ethanol concentration ($x_{ETH,Theor}$) is calculated as a function of sweet potato

moisture (x_{MST} , in kg/kg) and amount of potato added (x_{SWP} , in kg). The x_{SWP} value is the proportion in relation to the added volume of dilution water, so it actually means x_{SWP} (kg):1 L of dilution water.

$$x_{ETH,Theor}(L/L) = \frac{92(-1.121x_{MST}+1.05412)x_{SWP}}{142.02+142.02x_{MST}x_{SWP}+77.8(-1.121x_{MST}+1.05412)x_{SWP}} \quad (7.1)$$

Equation (7.1) considers ideal conditions, where is assumed that starch is completely hydrolyzed and all sugars are converted into ethanol.

For determining sweet potato moisture, three samples were analyzed thermogravimetrically (kiln at 105 °C).

With the experimental ($x_{ETH,Exp}$) and theoretical ($x_{ETH,Theor}$) ethanol concentration values, the efficiency of conversion (ϵ_{CONV}) was calculated by the following:

$$\epsilon_{CONV} = \frac{x_{ETH,Exp}}{x_{ETH,Theor}} \quad (7.2)$$

The viscosity before and after SHF was determined by a rotary viscometer (Quimis, model Q860M26).

The solids degradation from the beginning to the end of the SHF process appears in Figure 7.3. However, the residual amount of solids is still significant. So, after SHF, the Erlenmeyer flask contents were filtrated under vacuum (qualitative filter with pore size of 4 – 12 μm), and both the mass of slurry retained in the filter and that of the filtrate were quantified.

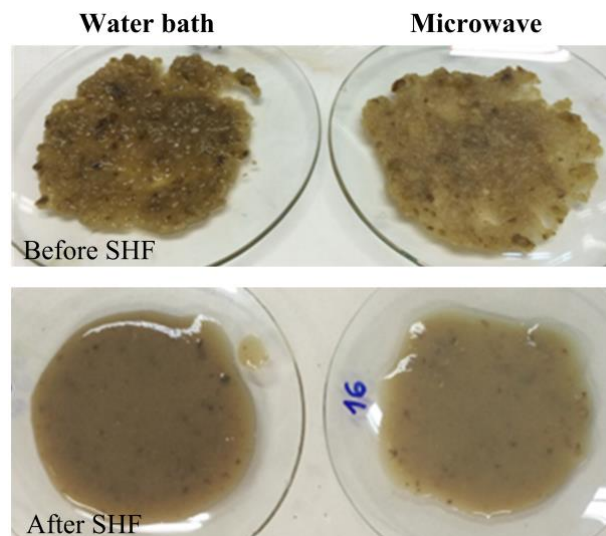


Figure 7.3: Solid degradation occurring in the SHF process.

In order to compare the processing costs, an ethanol micro-plant with daily production of 1000 L was simulated in the engineering equation solver (EES) software. The ethanol considered here is the hydrated fuel (with 0.935 kg/kg, according to Brazilian legislation) (Brasil, 2015). The electricity consumption during the steps of grinding and heating was quantified experimentally, using a multifunctional mini-ammeter (WF – D02A). The efficiencies in the heating processes were calculated as in Equation (7.3), which is the ratio between the theoretical energy consumption based on specific heat of sweet potato (cp_{SWP}) and the measured electrical energy consumed (EEC). The cp_{SWP} was assumed to be 4.33 kJ/kg·°C (based on Oluwo *et al.* (2013)).

$$\varepsilon_{HTG} = \frac{m_{SWP}cp_{SWP}\Delta T}{EEC} \quad (7.3)$$

Other consumptions and costs were estimated based on theoretical data and are presented in the following section.

7.3 Results

7.3.1 Experimental results

The samples were only collected at the end of the SHF process, i.e. after 19 h. This fermentation time was determined in a previous study (Schweinberger, 2015), where experiments were done according to a central composite design. In that study, time, temperature, and pH were considered, and the conditions that led to the highest conversion efficiencies for ethanol were found. In the present experiments, the main concern was about ethanol production at the end of the process, aiming to further increase the conversion efficiency. Therefore, no data of fermentation evolution over time is shown. The typical behaviour observed in previous experiments involving hydrolysis alongside fermentation is a continuous increase of ethanol concentration, while glucose is nearly zero. As glucose units from starch are released, they are readily consumed by the yeast, resulting in very low glucose concentration during the fermentation. In fact, there is a peak of glucose in the early hours of the process (< 5 h). Then, after a few hours, glucose content decreases to almost zero.

The fermentation and moisture results are shown in Table 7.1. The coefficient of variation (CV) is the ratio between the standard deviation and the mean value.

The results of $x_{ETH,Exp}$ and x_{MST} in Table 7.1 are expressed with capital letters and are the result of multiple comparisons of Tukey's test (more details on this method can be found in Toutenburg (2002)).

In Table 7.1, the mean values that do not share the same letter are significantly different according to the 95 % confidence level. For $x_{ETH,Exp}$, multiple comparisons occur among the postharvest date and the heating method. To illustrate how these mean values should be compared, consider the case with 4 days where for water bath and microwave heating the mean values were 0.0668^H and 0.0728^G, respectively. Since they

do not share the same letter, they should be considered different, whereas for the case with 18 days, the results for water bath 0.0769^{D,E} and microwave heating 0.0766^{D,E,F} should be considered equivalent. Additionally, the result for 32 days with water bath 0.0802^D can also be considered equivalent since it shares the letter D, meaning it belongs to the same statistically equivalent mean value.

The order of the letters is according to the magnitude, where "A" is given to the highest value and so on. For x_{MST} , the comparison is between the postharvest date, where the highest values begin with the letter "I".

Table 7.1: Fermentation results comparing water bath and microwave methods over 39 days after sweet potato harvest.

Days	Water bath		Microwave		x_{MST}^a (kg/kg)	$x_{ETH,Theor}$ (L/L)
	$x_{ETH,Exp}^a$ (L/L)	CV	$x_{ETH,Exp}^a$ (L/L)	CV		
4	0.0668 ^H	0.009	0.0728 ^G	0.0119	0.7626 ^{I,J}	0.0839 and 0.1059 ^b
11	0.0731 ^{F,G}	0.0164	0.0711 ^G	0.0202	0.7677 ^{I,J}	0.0814 and 0.1027 ^b
18	0.0769 ^{D,E}	0.0135	0.0766 ^{D,E,F}	0.0094	0.7703 ^I	0.0801
25	0.105 ^A	0.0346	0.0963 ^B	0.0110	0.753 ^L	0.0887
32	0.0855 ^C	0.0097	0.0802 ^D	0.0353	0.7621 ^J	0.0842
39	0.0738 ^{E,F,G}	0.0080	0.0782 ^{D,E}	0.0088	0.7541 ^L	0.0881

^a The mean values that do not share the same letter are significantly different, according to the Tukey test with 95 % of confidence.

^b In the first two weeks, the $x_{ETH,Theor}$ value was different for both methods; the lower one is related to water bath and the higher one to microwave heating, because the sweet potato proportion was different: 1.5:1 (kg: L) for water bath and 1.86:1 for microwave. From 18 days, it was 1.5:1 for both methods.

As mentioned in the Materials and Methods section, in the first two weeks there was a significant sweet potato mass loss during microwave heating (0.19 kg/kg), so the solids content was concentrated. To account for this, the sweet potato concentration was corrected from 1.5:1 to the proportion of 1.86:1 (kg:L, i.e SWP:water to dilution) when applying Equation (7.1) to calculate $x_{ETH,Theor}$ (shown in Table 7.1), since Equation (7.1) was developed for fresh sweet potatoes (without weight loss).

Later, after changing the way of covering the sweet potatoes during microwave heating, the mass loss was reduced to 0.0273 kg/kg, leading to a negligible error when assuming a sweet potato proportion of 1.5:1 (kg:L). The water bath always had negligible moisture loss. So, in the first two weeks the heating methods had different $x_{ETH,Theor}$, but a better comparison can be done through ϵ_{CONV} (Figure 7.4), where the differences are relativized.

Considering ϵ_{CONV} , the water bath was slightly superior: 9 % higher at 25 days, where the experimental peak was observed.

It is of note that the conversion efficiencies were > 1 at 25 days with both methods and at 32 days with water bath. This indicates that the sweet potatoes had more starch than was estimated by Equation (7.1).

These results do not disqualify the applicability of Equation (7.1), rather they indicate that it can be improved with new and more accurate experimental data. The starch analysis is responsible for this underestimation, mainly due to its incomplete hydrolysis. What became clear is that sweet potato starch is more susceptible to hydrolysis around 25 days after harvest (Figure 7.4). Therefore, in order to improve Equation (7.1), it is suggested to use new experimental starch data corresponding to this period.

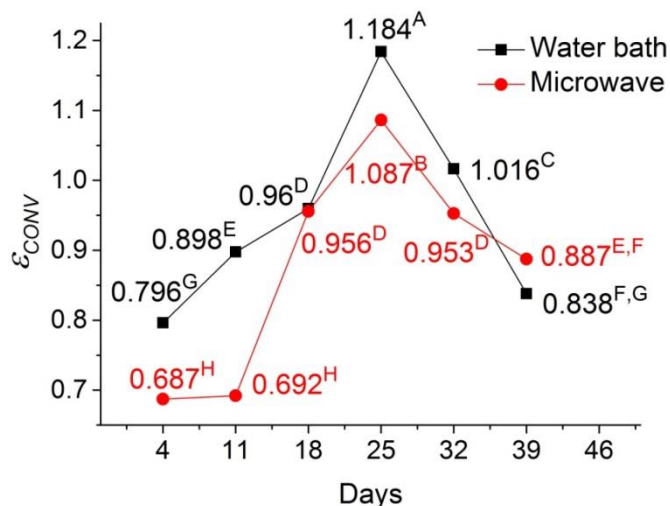


Figure 7.4: Fermentation results are expressed in conversion efficiency (ϵ_{CONV}). Mean values that do not share the same letter are significantly different, according to the Tukey test with 95 % of confidence.

Sweet potatoes have amylases naturally present in their composition, and the best results of hydrolysis over time are attributed mainly to the gradual activity of those enzymes. Thus, it is believed that interfering variables in potato metabolism may also influence both the synthesis and inactivation of amylases. These variables include growth conditions, harvest time, and storage conditions. Although there are studies considering these factors related to the nutritional composition of sweet potatoes, there are few works considering the concentration and activity of amylases. One of the exceptions is Zhang *et al.* (2002), who studied α -amylase activity during storage and found a peak of enzyme activity at around 60 days. In our similar study, we have found that 25 days is the most suitable time for ethanol production.

Due to the lack of specific studies relating amylase activity with sweet potato growth conditions, harvest time, and storage conditions, research that investigates this topic would be interesting, in order to identify which factors are most important for amylase activity and ethanol production. This would require a longer experiment to involve cultivation. However, the ripening time found in the present study is an important reference for future assays.

It is noteworthy that sweet potato shelf life can be enhanced, facilitating the supply. There are cheap and effective storage methods for retarding fungal damage, such as storage in pits, sand bed, saw dust, earthen pots, or heaps in the corner of a mud house.

The application of one of these storage methods may guarantee around two months of preservation. Furthermore, additional conservation techniques can be applied, further extending the shelf life to six months or even longer, including drying, curing, irradiation, chemical control, and bio-control (Ray and Tomlins, 2010). However, whenever opting for such resources, the optimum amylase activity must be ensured. For example, in the case of drying, ripening should take place first and then drying, because the higher temperatures during drying inactivate the amylases.

Although these points are interesting opportunities to study, they are not priorities of the GIMSCOP, where the focus is more on the process than on agronomic issues.

The mash viscosity at 25 °C was determined for both heating methods. Before the SHF, the viscosity was 2943 mPa·s with the water bath, and 3890 mPa·s with the microwave. The mash obtained with the microwave showed visibly higher cohesion, whereas with the water bath it was more like a suspension. This may explain the higher viscosity obtained with microwave heating. After SHF, the viscosity was 579 mPa·s with the water bath, and 727 mPa·s with the microwave.

In addition, after SHF, the content of Erlenmeyer flasks was vacuum filtered and the mass retained on the slurry was 43 %, the same for both methods.

7.3.2 Simulation and costs analysis

The project conceived by GIMSCOP has the goal of in the future migrating to larger scale tests. To estimate the cost involved in 1000 L/day ethanol production, the results obtained in our laboratory experiments have been scaled up by simulation studies. To compare the processing costs, an ethanol micro-plant was simulated. The considered costs for the inputs are shown in Table 7.2, which were defined based on consultation with suppliers. The values are expressed in Brazilian real (BRL or R\$), the Brazilian currency. At the conclusion of the cost analysis (Table 7.4), the cost of ethanol production is presented in R\$/L and US\$/L, where the conversion rate adopted for US dollars was 2.729 R\$/US\$.

Table 7.2: Considered costs for the inputs.

Inputs	Costs
Workers	66.74 R\$/(worker·day)
Feedstock	0.0622 R\$/kg
H ₂ O _{wash}	0.00528 R\$/kg
H ₂ O _{dilution}	0.00528 R\$/kg
Enzyme to hydrolysis	29.68 R\$/L
Enzyme to viscosity reduction	158.3 R\$/L
Yeast	32.75 R\$/kg
Antibiotic	10,000 R\$/kg
Electricity ^a	0.06863 and 0.07686 R\$/MJ
Eucalyptus firewood	0.006995 R\$/MJ

^aUntil the monthly consumption of 360 MJ is charged the lower value, for the excess is charged the higher.

108 Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods and cost analysis

For the cost of workers (Table 7.2), the regional minimum salary of Rio Grande do Sul State was considered, i.e. the monthly amount of R\$ 868, with 33.77 % additional due to labour benefits and 20 % insalubrity (medium degree), assuming 20 work days per month. For the cost of electricity, the rural tariff was assumed, where up to consumption of 360 MJ/month the amount of 0.06863 R\$/MJ is charged; any excess is charged at 0.07686 R\$/MJ. Thermal energy from eucalyptus firewood was considered for distillation and sweet potato heating in the conventional process. The energy required for heating with the microwave was counted as electrical energy.

Table 7.3 and Figure 7.5 show all the parameters and factors considered in the simulations. In Figure 7.5, the blue-coloured variables were fixed and the others calculated. The ethanol potential was calculated by applying Equation (7.1). Although its need for improvement was discussed, it is assumed that Equation (7.1) can still give an approximation.

Table 7.3: Simulation parameters and factors.

Factors	
Workers	3
H ₂ O _{wash}	0.3 kg/kg of SWP _{dirty}
Dirt in SWP _{dirty}	0.04 kg/kg of SWP _{dirty}
Enzyme to hydrolysis	0.003333 L/kg of SWP in db ^a
Enzyme to viscosity reduction	0.000333 L/kg of SWP in db
Yeast	0.0111 kg/kg of SWP in db
Antibiotic	0.000006 kg/kg of SWP in db
^b EEC _{SWP}	0.08899 MJ/kg of SWP
EEC _{mash}	0.06708 MJ/kg of mash

^adb: dry basis. ^bEEC: Electrical Energy Consumption

The moisture of sweet potatoes varies between 0.66 – 0.78 kg/kg, with an average near 0.7 kg/kg (Bradbury and Holloway, 1988; Oboh, Ologhobo and Tewe, 1989). Therefore, in the simulation shown in Figure 7.5, a sweet potato with 0.7 kg/kg of moisture was assumed as a reference.

Also in Figure 7.5 can be seen the additional simulation of a drying process, where final moisture is 0.08 kg/kg. Drying has the advantage of extending feedstock conservation, and due to volume reduction facilitates the transportation and storage. In contrast, processes containing a drying step demand greater energy and dilution water. With the simulation, it was possible to evaluate how much these factors influenced the final cost.

Heating efficiencies were measured for the equipment used in the experiments. For the water bath an efficiency of 0.276 was obtained and for the microwave, 0.417. In the grinding process, energy demand was the same for both heating methods, and equal to 0.079 MJ/kg of sweet potato. These experimental measurements were included in the simulation, even if for industrial equipment, efficiencies are possibly higher. The

electricity consumption that was not experimentally measured was estimated from Fabricio (2011). The total electricity consumption was calculated from EEC_{SWP} and EEC_{mash} factors (Table 7.3): the first was applied per kg of sweet potato until the step of dilution and grinding; the second was applied in the sequence, per kg of mash.

Table 7.4 shows cost results. It is of note that electricity costs for heating with the microwave are not accounted in "Electricity," but in $q_{heating}$.

Water consumption for cooling and steam was not accounted, by assuming a closed cycle and considering the losses negligible (moreover, water costs proved to be not very significant, as seen in Table 7.4). In winter, the fermentation requires heat to maintain the temperature at 34 °C, but this energy was also neglected. In preliminary calculations it was seen that this cost is not very expressive, and further, that heat demand can be harnessed from the process through energy integration.

Table 7.4 presents two alternatives for the yeast. In the first, the yeast is discarded at the completion of each batch. In the second, the yeast is recycled eleven times (Souza, 2005). It can be seen that recycling significantly reduces the final cost.

Production in a day:

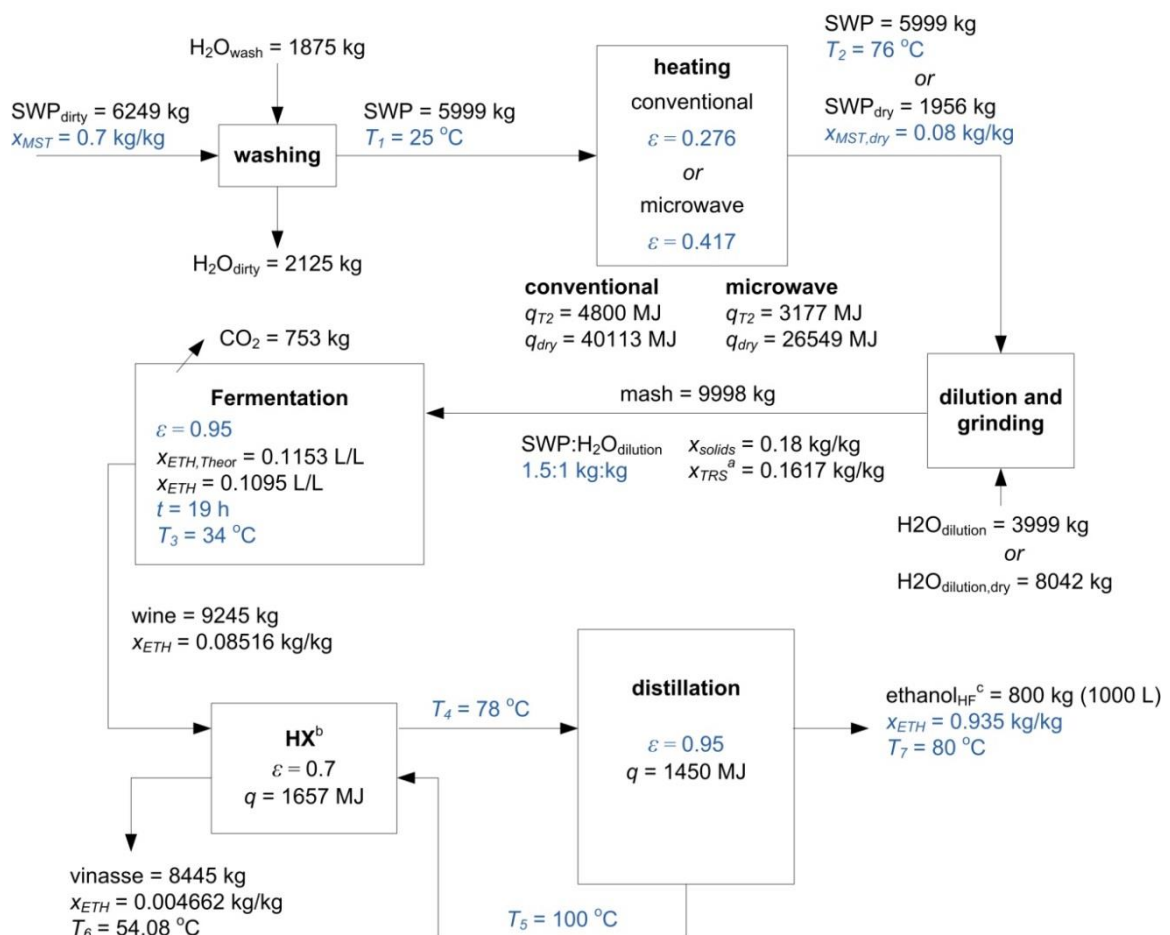


Figure 7.5: Process simulation for a day of production. Variables in blue were fixed and others were calculated. ^aTRS: total reducing sugars. ^bHX: heat exchanger. ^cHF: hydrated fuel.

110 Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods and cost analysis

Table 7.4: Results of costs per litre of ethanol-hydrated fuel, considering different scenarios.

	Alternative 1: yeast discarded				Alternative 2: yeast recycled 11 times			
	Conventional at 76°C		Microwave drying		Conventional at 76°C		Microwave drying	
R\$/L	1.79	2.06	2.00	3.82	1.20	1.47	1.41	3.22
US\$/L	0.66	0.75	0.73	1.40	0.44	0.54	0.52	1.18
Inputs and its % contribution in the final cost								
Workers	11.18	9.72	10	5.24	16.73	13.67	14.23	6.21
Feedstock	21.70	18.87	19.42	10.18	32.49	26.53	27.62	12.05
H ₂ O _{wash}	0.55	0.48	0.49	0.26	0.83	0.68	0.70	0.31
H ₂ O _{dilution}	1.18	2.06	1.06	1.11	1.76	2.90	1.50	1.32
Enzyme to hydrolysis	9.94	8.65	8.90	4.66	14.88	12.16	12.65	5.52
Enz. to visc. reduction	5.30	4.61	4.74	2.48	7.93	6.48	6.74	2.94
Yeast	36.52	31.76	32.68	17.13	4.97	4.06	4.23	1.84
Antibiotic	6.03	5.24	5.29	2.83	9.02	7.37	7.67	3.35
Electricity	5.16	4.49	4.62	2.42	7.73	6.31	6.57	2.87
q _{heating}	1.88	13.63	12.2	53.43	2.81	19.16	17.35	63.28
q _{distillation}	0.57	0.49	0.51	0.27	0.85	0.69	0.72	0.31

At the end of fermentation a substantial amount of solids remains, which might hamper the separation of yeast, but its reuse can be done through cell immobilization. Using the fermentation mash of sweet potatoes, Souza (2005) studied the reuse of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in spheres of calcium alginate. These spheres had a mean diameter of 2.9 mm. With this relatively large diameter, a simple sieving can separate the spheres.

In the present study, a preliminary test was done passing fermented mash through a 2 mm sieve and 16 % of the mass was retained. Due to this result, the future use of immobilized cells is considered possible in the applied methodology. The separation of solids spheres can be improved through a finer grinding of sweet potato, with a sieve > 2 mm, and with immobilization of spheres > 2.9 mm.

Except for the drying process with microwaves, when yeast is recycled the feedstock is the component with the greatest influence on the final cost (Table 7.4, alternative 2). The sweet potato moisture and conversion efficiency (ϵ_{CONV}) in fermentation are variables directly linked to the final cost of feedstock. For the same daily ethanol production, the amount of sweet potato will be greater at higher moistures and at lower conversion efficiencies. For this reason, the model of Figure 7.5 (with yeast recycling) was again simulated, varying the moisture and conversion efficiency. The solids concentration ($x_{solids} = 0.18$ kg/kg) was fixed instead of the sweet potato concentration (1.5:1 kg:kg), because the sweet potato moisture was varied in the simulation. To maintain 0.18 kg/kg of solids, the moisture differences were corrected with the dilution water. The effects of those variations on the final cost of 1 L of ethanol appears in Figure 7.6. Between the two variables, the one with the highest influence on the cost is moisture.

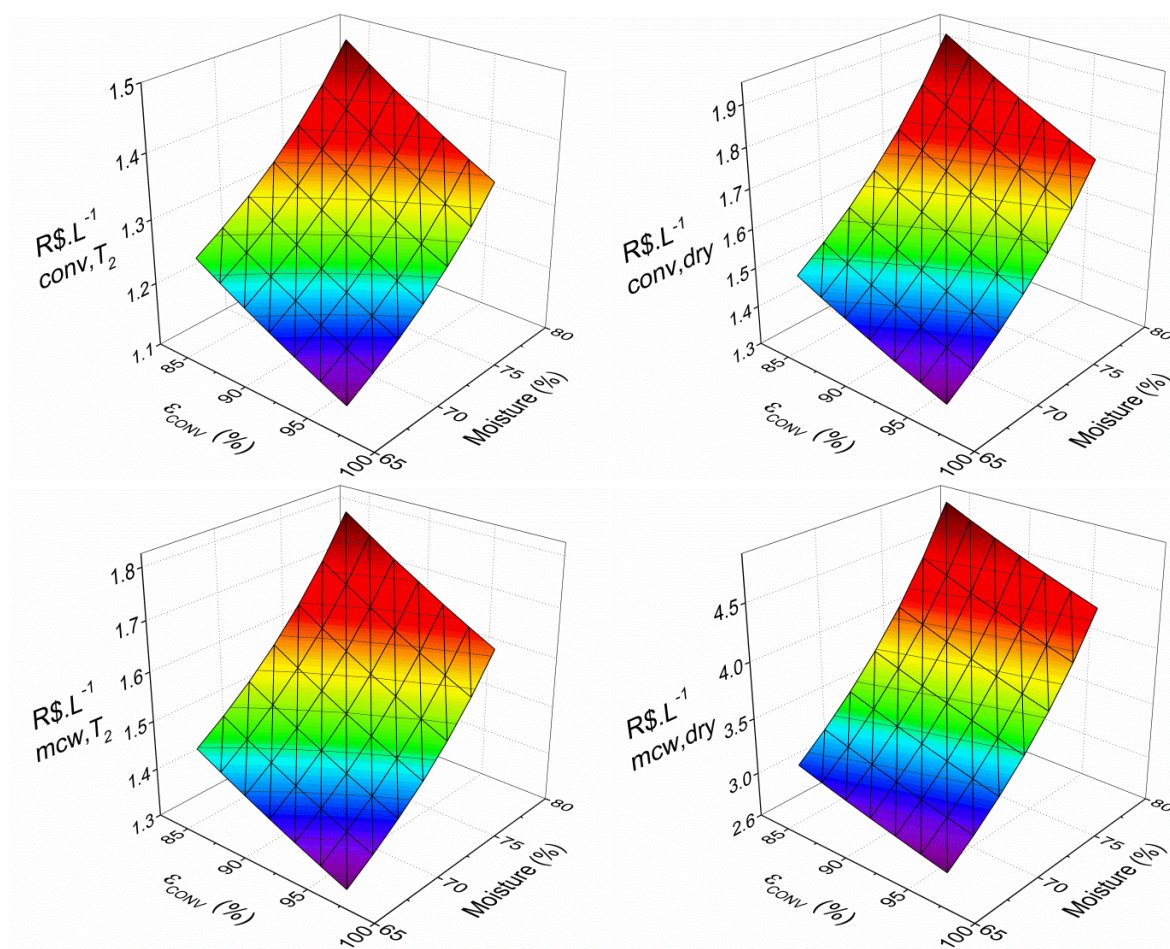


Figure 7.6: Costs per litre of ethanol (HF), evaluating variations in moisture of sweet potato and in conversion efficiency in fermentation. Results were generated by simulating the model of Figure 7.5. It was considered that yeast was recycled 11 times. On the ordinate axis: conv = conventional heating method; mcw = microwave heating; and $T_2 = 76\text{ }^\circ\text{C}$.

From January to August 2014, the hydrated ethanol fuel in the Rio Grande do Sul (RS) had an average retail price of 2.49 ± 0.05 R\$/L. However, the value that can be paid to the producer must be considered. This value can be estimated from the prices in São Paulo (SP), which produces the most ethanol imported in the Rio Grande do Sul. The producers in São Paulo (SP) received 1.28 ± 0.08 R\$/L per litre of ethanol from January to August 2014. In the same period the price in SP for the final consumer was 1.95 ± 0.07 R\$/L (UNICA, 2015). If we correct the value paid in SP with the logistical and different tax costs, a value of ~ 1.5 R\$/L in RS may be estimated to be competitive with SP. Therefore, this value is considered a threshold for defining the economically feasible region in Figure 7.6.

Considering this, the conventional process (at $76\text{ }^\circ\text{C}$ and with drying) and using a microwave at $76\text{ }^\circ\text{C}$ may be potentially considered feasible. The drying process with the microwave had a considerably high cost, but this was under the conditions established in the simulation. The use of a microwave with higher heating efficiency and the use of cheaper electrical energy may change this scenario. One possibility to reduce the electricity cost would be its generation in the plant itself.

Although the results with the conventional method were more favourable, with the appropriate improvements the microwave process may become more attractive, since

the advantage of a microwave oven compared to conventional equipment is that it is compact and heats more quickly.

Brazil stands out worldwide for its ethanol production, where the production from sugarcane is already a consolidated process. The sweet potato as a feedstock is an alternative for the Rio Grande do Sul state, where sugarcane cultivation is not feasible. When the feedstock is changed, there are changes to be made in the production technology. For a new technology to be implemented, it must work well and be financially feasible.

In this context, in order to make ethanol production from sweet potato a competitive process, some issues must still be solved. A challenging problem is related to the high solids concentration, which makes both ethanol distillation and yeast recovery and reuse difficult. This study focused on the ethanol production cost and its profitability. However, it is of note that more revenue could be generated from coproducts, such as solid fermentation waste and the aerial parts of the roots for animal feed. Additionally, the production of sweet potatoes both for human consumption and for ethanol production should be considered, where excess potatoes or those rejected for human consumption could be destined for ethanol production. All of these factors can make this business more profitable.

7.4 Conclusions

The present study shows that for ethanol production, it is better to let sweet potatoes ripen for a specified time than to process them soon after harvest. Experiments found that the maximum value of ethanol production and conversion efficiency was achieved 25 days after harvest. Taking the average conversion efficiency between the two heating methods, the lowest and highest values achieved were 0.74 (4 days) and 1.13 (25 days), an expansive increase of 53 %. Efficiencies > 1 do not occur in reality, so the theoretical equation applied to estimate ethanol potential was found to underestimate the starch content and must therefore be corrected. The proposal is to rebuild it, obtaining new points when sweet potatoes are ~25 days after harvest, since this was the point where the peak was observed experimentally.

Microwave heating did not increase the conversion efficiency, as was initially supposed. The conventional heating method demonstrated slightly superior performance in terms of conversion efficiency (9 % higher, at 25 days).

The financial analysis suggests that the conventional process (at 76 °C and with drying) and using the microwave at 76 °C may be considered potentially feasible. The most critical costs occurred when drying with the microwave. However, other experiments with microwaves could be performed to develop a prototype with higher energy efficiency and specific to the process under study, aiming to reduce electricity consumption.

The cost of yeast has a large impact on final cost of the process, but when yeast recycle 11 times was assumed, the cost was reduced by 87 % on average. This possibility should be investigated and experimentally improved. When yeast recycling is considered,

the feedstock stand out as a major factor in the cost. Through evaluating variables directly linked to the final feedstock cost, such as moisture of sweet potato and conversion efficiency in fermentation, the sweet potato moisture was seen to have a major impact.

The present work was able to answer the questions highlighted at the beginning about the effects of ripening and microwave heating in conversion efficiency into ethanol production. Additionally, production costs were evaluated, indicating that yeast recycle is a critical point for the financial feasibility of the process.

7.5 References

ANGEL. **Angel Thermal Resistance Alcohol Active Dry Yeast**. Hubei, China: ANGEL YEAST CO., LTD. 2015.

BRADBURY, J. H.; HOLLOWAY, W. D. Chemistry of Tropical Root Crops: significance for nutrition and agriculture in the Pacific. **ACIAR Monograph No. 6**. Melbourne: Ramsay Ware Printing 1988.

BRASIL. **Resolução ANP Nº 19**, 2015.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 9// 2007. ISSN 0960-8524. Available in: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407000156> >.

FABRICIO, A. M. **Determinação dos custos de produção do etanol a partir da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pelo método de custeio baseado em atividades (ABC)**: Dissertation, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2011.

FAN, D. *et al.* Determining the effects of microwave heating on the ordered structures of rice starch by NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1395-1401, 2013a. Available in: <
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84869885726&partnerID=40&md5=6abd1d886edec943c384cf16cee9a95f> >.

_____. 1H NMR studies of starch-water interactions during microwave heating. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 406-412, 2013b. Available in: <
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84885409814&partnerID=40&md5=c5de941c0cf4143a5842e99a7700e028> >.

GENENCOR. **STARGEN™ 002. Granular Starch Hydrolyzing Enzyme for Ethanol Production**. Danisco US Inc., 2009.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, n. 0, p. 550-567, 1// 2015. ISSN 1364-0321. Available in: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114007084> >.

HARRIS, P. V. *et al.* New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 0, p. 162-170, 4// 2014. ISSN 1367-5931. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593114000271> >.

INOKUMA, K. *et al.* Efficient co-displaying and artificial ratio control of α -amylase and glucoamylase on the yeast cell surface by using combinations of different anchoring domains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-9, 2014/11/30 2014. ISSN 0175-7598. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6250-1> >.

MASIERO, S. S. **Microusinas de etanol de batata-doce: viabilidade econômica e técnica**: Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 2012.

NOVOZYMES. **Pectinex® Ultra AFP. Product Data Sheet**. Novozymes, 2009.

OBOH, S.; OLOGHOBO, A.; TEWE, O. Some aspects of the biochemistry and nutritional value of the sweet potato (*Ipomea batatas*). **Food Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 9-18, // 1989. ISSN 0308-8146. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0308814689901465> >.

OLUWO, A. A.; KHAN, R. M.; SALAMI, M. J. E. Effect of tuber skin on the thermal properties of whole tubers of potato and sweet potato. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. 53, 2013.

PALACIOS-BERECHE, R. *et al.* Double-effect distillation and thermal integration applied to the ethanol production process. **Energy**, v. 82, n. 0, p. 512-523, 3/15/ 2015. ISSN 0360-5442. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360544215000869> >.

PALAV, T.; SEETHARAMAN, K. Mechanism of starch gelatinization and polymer leaching during microwave heating. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 3, p. 364-370, 2006. Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33746478603&partnerID=40&md5=c693efd1a61e8889d449ed75be3fcc76> >.

_____. Impact of microwave heating on the physico-chemical properties of a starch-water model system. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 596-604, 2007. Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33846213663&partnerID=40&md5=41115297b7daa5d2a53affab710dab83> >.

RAY, R. C.; TOMLINS, K. I. **Sweet Potato: Post Harvest Aspects in Food, Feed and Industry**. Nova Science Publishers, 2010.

RISSO, R. D. S. **Etanol de Batata-doce: Otimização do Pré-processamento da Matéria-prima e da Hidrólise Enzimática**: Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 2014.

ROBERTSON, G. H. *et al.* Native or Raw Starch Digestion: A Key Step in Energy Efficient Biorefining of Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 353-365,

2006/01/01 2005. ISSN 0021-8561. Available in: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf051883m> >.

SAHA, S.; RAMACHANDRAN, S. Genetic improvement of plants for enhanced bio-ethanol production. **Recent Patents on DNA and Gene Sequences**, v. 7, n. 1, p. 36-44, 2013. Available in: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875974984&partnerID=40&md5=c30802f6915a01a353bdc94cd6571cd7> >.

SCHWEINBERGER, C. M. **Inovação e Otimização no Processo de Produção de Etanol a Partir de Batata-doce**. Porto Alegre: Qualifying Project for PhD Thesis in Chemical Engineering, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2015.

SOUZA, A. F. B. C. E. **Avaliação do processo de hidrólise e fermentativo de biomassa de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] por meio de células imobilizadas para produção de etanol**. Dissertation, Universidade Federal do Tocantins (UFT), 2005.

TODRI, E. *et al.* Global sensitivity analysis and meta-modeling of an ethanol production process. **Chemical Engineering Science**, v. 114, n. 0, p. 114-127, 7/26/ 2014. ISSN 0009-2509. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250914001857> >.

TOUTENBURG, H. **Statistical Analysis of Designed Experiments**. 2. Springer, 2002.

UNICA. UNICADATA. 2015. Available in: < <http://www.unicadata.com.br/> >.

VOHRA, M. *et al.* Bioethanol production: Feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 573-584, 3// 2014. ISSN 2213-3437. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343713002054> >.

ZHANG, Z.; WHEATLEY, C. C.; CORKE, H. Biochemical changes during storage of sweet potato roots differing in dry matter content. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 3, p. 317-325, 4// 2002. ISSN 0925-5214. Available in: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521401001491> >.

7.6 Apêndice – Atualização da análise de custos

O artigo apresentado neste capítulo foi submetido em março/2015. Como os custos sofrem modificações ao longo do tempo, neste apêndice é feita uma nova estimativa de custos para a produção de etanol com os dados atualizados em março/2016.

O salário mínimo regional deve aumentar, mas ainda não ficou estabelecido o valor, em consulta a um contador (Egewart, 2016) se obteve que o valor estimado de R\$ 1.103,54, que então foi adotado nesta nova análise de custos. As tarifas de energia elétrica e de água foram atualizadas com a reconsulta no site de fornecedores (AES Sul; CORSAN, 2016). Os preços das enzimas e da levedura foram dados em dólar e, portanto, o valor do dólar foi atualizado para o valor de R\$ 4,00 (cotado em 01/03/2016). Quanto ao preço da matéria-prima, lenha e antibiótico, seus valores foram estimados considerando a inflação oficial de 2015 de 10,67% (Cury e Rodrigues, 2016). Os valores atualizados dos custos dos insumos podem ser vistos na Tabela A1, e os resultados de custos por litro de etanol podem ser vistos na Tabela A2.

Na Tabela A3 há uma comparação entre os custos apresentados no artigo com os custos atualizados neste apêndice, onde o aumento médio considerando todos os casos resulta em 30,87%. Em Unica (2016) consta que o preço médio do EHC no RS no mês de março de 2015 foi R\$/L 2,666, enquanto que a informação mais atual é do mês de janeiro de 2016, sendo o valor de R\$/L 3,479 (consultado no dia 01/03/2016). Logo, de março/2015 a jan/2016 houve um aumento de 30,50% no preço do etanol. Observa-se então que o aumento no preço acompanhou em proporção aproximada o aumento nos custos, de maneira que as conclusões sobre viabilidade discutidas no artigo podem ser consideradas ainda válidas nesta segunda análise.

Tabela A1: Custos considerados para as entradas.

Entradas	Custos
Empregados	84,85 R\$/trabalhador·dia)
Matéria-prima	0,0688 R\$/kg
H ₂ O _{lavagem}	0,00568 R\$/kg
H ₂ O _{diluição}	0,00568 R\$/kg
Enzima para hidrólise	43,51 R\$/L
Enzima para a redução de viscosidade	232 R\$/L
Levedura	48 R\$/kg
Antibiótico	11.067 R\$/kg
Eletricidade ^a	0,09757 and 0,1093 R\$/MJ
Lenha de eucalipto	0,007741 R\$/MJ

^aAté o consumo mensal de 360 MJ é tarifado o menor valor, para o excesso é cobrado o maior.

Tabela A2: Resultados dos custos por litro de etanol hidratado combustível, considerando diferentes cenários.

	Alternativa 1: levedura descartada				Alternativa 2: levedura reciclada 11 vezes			
	Convencional		Micro-ondas		Convencional		Micro-ondas	
	76°C	Secag.	76°C	Secag.	76°C	Secag.	76°C	Secag.
R\$/L	2,38	2,67	2,69	5,26	1,50	1,80	1,81	4,39
US\$/L	0,60	0,67	0,67	1,32	0,38	0,45	0,45	1,10
Entradas e suas contribuições em % sobre o custo final								
Empregados	10,71	9,53	9,48	4,84	16,92	14,14	14,03	5,80
Matéria-prima	18,09	16,09	16,01	8,17	28,58	23,88	23,7	9,79
H ₂ O _{lavagem}	0,45	0,40	0,39	0,20	0,71	0,59	0,59	0,24
H ₂ O _{diluição}	0,96	1,71	0,85	0,87	1,51	2,54	1,25	1,04
Enzima p/ hidrólise	10,98	9,77	9,72	4,96	17,35	14,49	14,38	5,94
Enz. p/ red. viscosidade	5,85	5,20	5,18	2,64	9,24	7,72	7,66	3,17
Levedura	40,36	35,88	35,70	18,22	5,80	4,84	4,81	1,99
Antibiótico	5,03	4,47	4,45	2,27	7,94	6,64	6,59	2,72
Eletricidade	5,53	4,92	4,90	2,50	8,74	7,30	7,24	2,99
Q _{aquecimento}	1,56	11,62	12,92	55,12	2,47	17,24	19,13	66,07
Q _{destilação}	0,47	0,42	0,42	0,21	0,75	0,62	0,62	0,26

Tabela A3: Comparações entre os custos da análise no artigo com a análise atualizada.

	Alternativa 1: levedura descartada				Alternativa 2: levedura reciclada 11 vezes			
	Convencional		Micro-ondas		Convencional		Micro-ondas	
	76°C	Secag.	76°C	Secag.	76°C	Secag.	76°C	Secag.
R\$/L (anterior)	1,79	2,06	2,00	3,82	1,20	1,47	1,41	3,22
R\$/L (atualizado)	2,38	2,67	2,69	5,26	1,50	1,80	1,81	4,39
Aumento (%)	32,96	29,61	34,50	37,70	25,00	22,45	28,37	36,34

Referências

AES Sul. Disponível em: < <https://www.aessul.com.br/areacliente/servicos/taxase.bt.asp> >. Acesso em: 01 março 2016.

CORSAN. Disponível em: < <http://www.corsan.com.br/upload/arquivos/201512/16095718-tabela-tarifaria-especial.pdf> >. Acesso em: 01 março 2016.

CURY, Anay; RODRIGUES, Matheus. Inflação oficial fica em 10,67% em 2015, a maior desde 2002. **G1 Economia**. 08 jan 2016. Disponível em: < <http://g1.globo.com/economia/noticia/2016/01/inflacao-oficial-fica-em-1067-em-2015.html> >. Acesso em: 01 março 2016.

118 Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods and cost analysis

EGEWARTH, Romeu (contador), 2016.

UNICA. UNICADATA. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/> >. Acesso em: 01 março 2016.

PARTE III

Pós-processamento: separação do etanol

Capítulo 8 – Utilização do CO₂ em misturas de etanol e análise do equilíbrio de fases

Resumo

O uso de CO₂ para extrair etanol do vinho de fermentação não é uma técnica nova, na literatura encontra-se um número razoável de artigos com tal aplicação. O emprego do CO₂ tem sido justificado pela redução do efeito inibitório que o etanol exerce sobre levedura. Há também uma proposta diferente, onde o CO₂ é injetado durante a destilação, esta possibilidade é interessante porque pode levar a uma redução no consumo energético, mas o estudo sobre esta proposta deve iniciar investigando as condições de equilíbrio da mistura. No presente estudo foi implementado um modelo de equilíbrio, e os resultados do modelo foram comparados com resultados experimentais da mistura etanol-água-CO₂. Também, foram realizados experimentos com um vinho de batata-doce. As vazões de CO₂ variaram entre 4,6 – 9 L/min. O comportamento da mistura etanol-água-CO₂ não se adequou ao predito pelo modelo teórico implementado, provavelmente devido ao arraste causado vazão de CO₂ não ser desprezível. Contudo, os resultados experimentais mostraram que se conseguem maiores concentrações de etanol no condensado nas menores vazões de CO₂, e também as concentrações foram maiores do que nas condições de equilíbrio previstas pelo modelo. Os resultados deste artigo foram os primeiros do estudo experimental desenvolvido no GIMSCOP, norteados tanto para o aperfeiçoamento do aparato experimental, quanto para outros pontos experimentais a estudar, como experimentos em menores vazões de CO₂ e também sobre a melhor temperatura de condensação.

Palavras-chave: Equilíbrio termodinâmico de mistura, água-etanol-CO₂, vinho de batata-doce, destilação.

8.1 Introdução

O processo que utiliza um gás para remoção de componentes em um líquido é usualmente chamado de esgotamento ou dessorção. Na literatura existem estudos sobre o emprego de CO₂ para a recuperação de etanol a partir do vinho de fermentação, tais como os trabalhos de Hashi, Tezel e Thibault (2010), Pinto (2014), Ponce *et al.* (2014) e Sonego *et al.* (2014). Embora as obras citadas sejam recentes, o emprego CO₂ começou há mais de duas décadas (Sato *et al.*, 1988; Pham *et al.*, 1989). A utilização de CO₂ é interessante porque ele é um produto da fermentação, mas se deve salientar que outro gás inerte também pode ser usado, como o ar e o nitrogênio (Zhang, Liu e Liu, 2005; Taylor *et al.*, 2010).

A aplicação do esgotamento tem sido justificada principalmente pela redução do efeito inibidor que o etanol exerce sobre a levedura. Desta forma, a remoção do etanol ocorre simultaneamente com a fermentação, ou, uma corrente do vinho é enviada para uma coluna de stripping, após a extração a fase gasosa vai para a recuperação enquanto que o vinho retorna para a fermentação. Com tal característica do processo a extração ocorre em apenas um estágio.

Com o objetivo da redução da inibição do etanol sobre a levedura, Ponce *et al.* (2014) estudaram o processo de esgotamento através de simulações, com o vinho entrando na coluna a 35°C. Considerando uma vazão de CO₂ de 6 L/min e a temperatura de condensação de -2°C, os autores relataram uma redução no teor de etanol no vinho de 11% para 6,6% (m/m), a eficiência de separação global do etanol foi estimada em 56,9%.

Ponce *et al.* (2014) também enfatizaram sobre o emprego do CO₂ e a influência na temperatura de condensação, quanto maior for a vazão de CO₂ menor deverá ser a temperatura de condensação. Na condições anteriormente citadas, de todo etanol alimentado na coluna de stripping 71% condensou.

Pinto (2014) realizou experimentos com o objetivo de estudar o efeito da vazão de CO₂ e a temperatura do vinho, os resultados são apresentados na Tabela 8.1. Existem algumas lacunas nesta Tabela devido ao delineamento experimental empregado. Em seu trabalho, Pinto (2014) não especifica a matéria-prima utilizada, mas provavelmente era cana-de-açúcar, porque em estudos realizados no Brasil esta é a matéria-prima convencional, quando uma diferente é utilizada ela é então especificada.

De acordo com a legislação brasileira, o etanol hidratado combustível deve ter no mínimo 94,5% em volume (Brasil, 2015). Nota-se na Tabela 8.1 que as maiores concentrações de etanol no volume extraído ocorrem nas menores vazões de CO₂ e menores temperaturas, no entanto, nestas condições a recuperação de etanol é mais baixa, devido ao baixo volume extraído. Com temperaturas e vazões de CO₂ mais elevadas é possível a recuperação de cerca de 90%, mas com um teor de etanol ficando em aproximadamente 50% (v/v), de maneira que seria necessária uma etapa adicional de concentração.

Neste contexto, no trabalho de Sidou (2014) se propõe utilizar a injeção de CO₂ na coluna de destilação, na literatura não foi encontrada outra proposta nesta mesma linha. A vantagem desta combinação é que os múltiplos estágios da destilação permitem uma maior concentração do etanol, enquanto que o esgotamento pode levar a um menor consumo energético.

Tabela 8.1: Extração de etanol por esgotamento com CO₂. Resultados experimentais^a: Concentração de etanol no extraído (CE), Volume extraído (VE) e Etanol Recuperado (ER)^b.

T_{vinho} (°C)		Vazão de CO ₂ (vvm) ^c					
		0,1	0,2	0,3	0,5	0,75	1
33	CE (% v/v)	99,36		95,26	99,42		74,11
	VE (L)	0,25		0,88	1,48		3,77
	ER (%)	2,68		8,94	14,74		28,58
49	CE (% v/v)		84,66			62,37	
	VE (L)		1,36			7,37	
	ER (%)		12,52			50,69	
65	CE (% v/v)	58,55		54,12	50,96		48,33
	VE (L)	2,92		6,23	11,93		18,11
	ER (%)	20,17		42,19	69,40		93,23

FONTE: Pinto (2014).

^aConcentração inicial de etanol no vinho: $9,61 \pm 0,6 \%$ ($v.v^{-1}$), volume inicial do vinho: $95 \pm 0,15$ L, tempo da operação: 8h

^bER = $100 \times (\text{Etanol no volume extraído}) / (\text{Etanol inicial no vinho})$

^cvvm: volume de gás injetado por volume de meio, por minuto

O estudo de Sidou (2014) consistiu na simulação do sistema etanol-água-CO₂ admitindo estágios de equilíbrio, na Figura 8.1 se tem uma representação do modelo adotado. Um resultado importante de Sidou (2014) foi que quando a fração molar de CO₂ no vapor fica entre 0,7 e 0,9 a temperatura no revededor pode ser reduzida para valores entre 64 e 41 °C, o que poderia possibilitar uma redução energética considerável em comparação com o processo convencional, no qual a temperatura fica no em torno de 100°C, além da redução da degradação térmica da parte sólida do mosto.

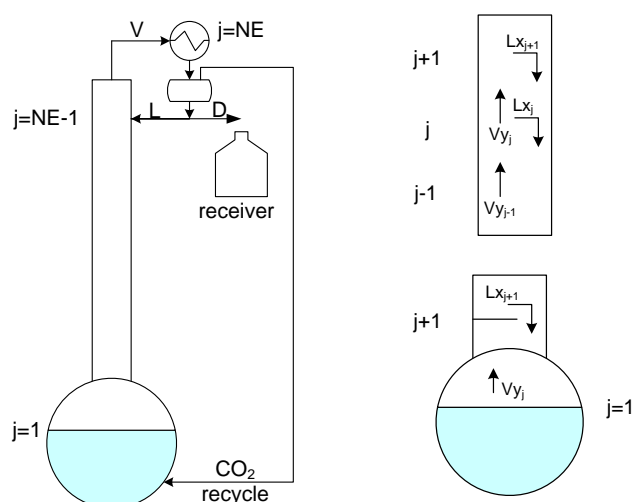


Figura 8.1: Modelo de destilação em batelada com injeção de CO₂.

FONTE: Adaptado de Sidou (2014).

O trabalho de Sidou (2014) incentivou o presente estudo, onde experimentos foram realizados para verificar se a condição de equilíbrio simulada pode ser verificada na

prática. Foram realizados experimentos com a injeção de CO₂ na mistura água-etanol e também em vinho de batata-doce.

A batata-doce foi selecionada porque Masiero (2012) em seu estudo identificou esta matéria-prima como a mais promissora para a produção de etanol no Estado do Rio Grande do Sul. Schweinberger *et al.* (2016) realizaram experimentos de fermentação com batata-doce, trabalharam com uma concentração de batata-doce fixada em 1,5 kg:L resultando em teores de etanol em torno de 10% (v/v), e onde na filtração a vácuo após a fermentação constataram que 43% da massa ficou retida na torta. Considerando a particularidade do vinho de batata-doce, de composição mais complexa, com elevada viscosidade e sólidos residuais, o estudo das condições de equilíbrio se torna importante para o futuro processo de recuperação.

8.2 Materiais e métodos

A metodologia deste estudo consistiu em duas partes, a primeira é relativa à implementação do modelo de equilíbrio etanol-água-CO₂, a segunda parte se refere ao estudo experimental.

8.2.1 Modelo termodinâmico de equilíbrio da mistura

Matematicamente, o equilíbrio termodinâmico da mistura é determinado pela igualdade fugacidades: $\hat{f}_i^V = \hat{f}_i^L$. Nos cálculos, a pressão foi mantida constante em 1 atm. Como é uma pressão relativamente baixa, assumiu-se o comportamento do gás ideal para fase vapor, assim o cálculo de fugacidade é simplificado:

$$\hat{f}_i^V = y_i P \quad (8.1)$$

onde y_i é a fração molar do componente i na fase vapor. Sendo x_i a fração molar do componente i na fase líquida, a fugacidade foi calculada como:

$$\hat{f}_{H_2O/ET}^L = \gamma_i x_i P_i^{sat} \quad (8.2)$$

$$\hat{f}_{CO_2}^L = x_i H \quad (8.3)$$

O coeficiente de atividade (γ) é utilizado para corrigir o desvio da idealidade e pode ser calculado através de diferentes formulações, as mais comuns são de Margules, van Laar, Wilson, NRTL, UNIFAC e UNIQUAC (Poling, Prausnitz e O'Connell, 2001).

Apesar da mistura em estudo ser ternária, foi adotado o modelo de Wilson para etanol-água porque não foram encontrados dados na literatura para a mistura etanol-água-CO₂. Considerou-se que o teor de CO₂ no líquido é tão baixo que não influencia no coeficiente de atividade. De fato, nas simulações foram estimadas frações molares de CO₂ no líquido na magnitude de $4,28 \times 10^{-5} - 3,9 \times 10^{-3}$.

A formulação de Wilson para uma mistura binária é apresentada nas Eqs. 8.4 a 8.7. R é a constante dos gases ideais, v o volume molar e $\Delta\lambda$ um parâmetro relacionado à energia de interação. Para a mistura etanol e água esses valores são facilmente

encontrados na literatura, neste trabalho foram adotados os dados apresentados em Voutsas *et al.* (2011), onde $\Delta\lambda/R = f(T)$.

$$\ln \gamma_1 = -\ln (x_1 + x_2 \Lambda_{12}) + x_2 \left(\frac{\Lambda_{12}}{x_1 + \Lambda_{12}x_2} - \frac{\Lambda_{21}}{x_2 + \Lambda_{21}x_1} \right) \quad (8.4)$$

$$\ln \gamma_2 = -\ln (x_2 + x_1 \Lambda_{21}) - x_1 \left(\frac{\Lambda_{12}}{x_1 + \Lambda_{12}x_2} - \frac{\Lambda_{21}}{x_2 + \Lambda_{21}x_1} \right) \quad (8.5)$$

$$\Lambda_{12} = \frac{v_2}{v_1} \exp \left(\frac{-\Delta\lambda_{12}}{RT} \right) \quad (8.6)$$

$$\Lambda_{21} = \frac{v_1}{v_2} \exp \left(\frac{-\Delta\lambda_{21}}{RT} \right) \quad (8.7)$$

Para calcular a pressão de saturação foi utilizada a equação de Riedel modificada (Perry e Green, 2007):

$$\ln P^{sat} = A + \frac{B}{T} + C \ln T + DT^E \quad (8.8)$$

Para solubilidade do CO₂ no estado de equilíbrio foi utilizada a constante de Henry (H , Eq. 8.3). Na literatura podem ser encontrados dados sobre a solubilidade do CO₂ em água e em menor grau em etanol. No entanto, em etanol-água os dados são escassos, por esta razão Dalmolin *et al.* (2006) realizou experimentos com diferentes concentrações de etanol e a diferentes temperaturas, com tais resultados eles calcularam os valores da constante de Henry, os quais são apresentados na Tabela 8.2.

Tabela 8.2: Constante de Henry (atm) para o CO₂ em etanol-água em diferentes temperaturas e composições.

x_{ET} (fração molar)	Temperatura (K)			
	288	298	308	323
0.1	1199	1546	1794	2134
0.25	846	965	1097	1227
0.5	399	441	502	580
0.75	234	272	298	345
0.9	169	197	228	275

FONTE: Dalmolin *et al.* (2006).

Para simular os diferentes estágios de equilíbrio é necessário mais do que valores pontuais, assim, os dados de Henry da Tabela 8.2 foram ajustados a uma curva muito empregada para calcular a constante de Henry em função da temperatura (Perry e Green, 2007):

$$\log H = A + \frac{B}{T} + C \log T + DT \quad (8.9)$$

Os valores dos parâmetros são dependentes da concentração de etanol, de modo que foi utilizado um polinômio de terceiro grau para descrever esta relação e o resultado é apresentado na Tabela 8.3. Devido ao uso dos dados da Tabela 8.2, a unidade da Eq. 8.9 é

atm, T deve ser em K and x_{ET} em fração molar. Todo o equacionamento foi implementado em MATLAB.

Tabela 8.3: Ajuste dos parâmetros para a Eq. 8.9.

Parâmetro	Polinômio
A	$-2373x_{ET}^3 + 3804x_{ET}^2 - 1744x_{ET} + 195.3$
B	$78916x_{ET}^3 - 132820x_{ET}^2 + 66186x_{ET} - 9658.7$
C	$907.07x_{ET}^3 - 1435x_{ET}^2 + 641x_{ET} - 64$
D	$-0.4561x_{ET}^3 + 0.6489x_{ET}^2 - 0.2237x_{ET} - 0.0039$

8.2.2 Estudo experimental

Nesta etapa diferentes misturas foram avaliadas, conforme pode ser visto na Tabela 8.4.

Tabela 8.4: Misturas estudadas nos experimentos

Mistura	Vazão de CO ₂ (L/min)
Etanol-água	-
	4,6
Etanol-água-CO ₂	6,8
	9
Vinho de batata-doce	-
	5,7
Vinho de batata-doce e CO ₂	9

O procedimento experimental consistiu no aquecimento da mistura em estudo, coleta de amostras em diferentes temperaturas e então a verificação da composição correspondente.

A montagem do aparato experimental é apresentada na Figura 8.2. 200 mL da mistura em estudo eram adicionados em um balão de 1 L (A), o aquecimento foi realizado com uma manta de aquecimento (B), o aumento da temperatura foi acompanhado através de três termopares do tipo T posicionados em três pontos: no fundo do balão, na interface líquido-vapor no tempo inicial e na saída do vapor (C). Os termopares foram previamente calibrados com um sensor de temperatura de referência, o erro médio da calibração foi de $\pm 1,12$ °C. Amostras do líquido foram recolhidas através de uma seringa (D). Com um condensador acoplado (E), o vapor era condensado e então as amostras foram recolhidas. A composição das amostras foi analisada utilizando um refratômetro digital da Atago modelo PAL-RI.

Nos experimentos com a mistura sintética de água e etanol (etanol-água e etanol-água-CO₂) a mistura líquida foi ajustada para uma concentração volumétrica de etanol em 67%. Também, nestes experimentos foram adicionadas 120 g de pérolas de ebulição.

Nos experimentos com vinho de batata-doce, embora a fermentação resultasse em teores de etanol no entorno de 10% em volume, foi adicionado etanol no vinho para se atingir uma concentração de 25%, visando ampliar a região experimental de

caracterização. Nestes experimentos não foram adicionadas pérolas de ebulição, devido à presença de sólidos no vinho.

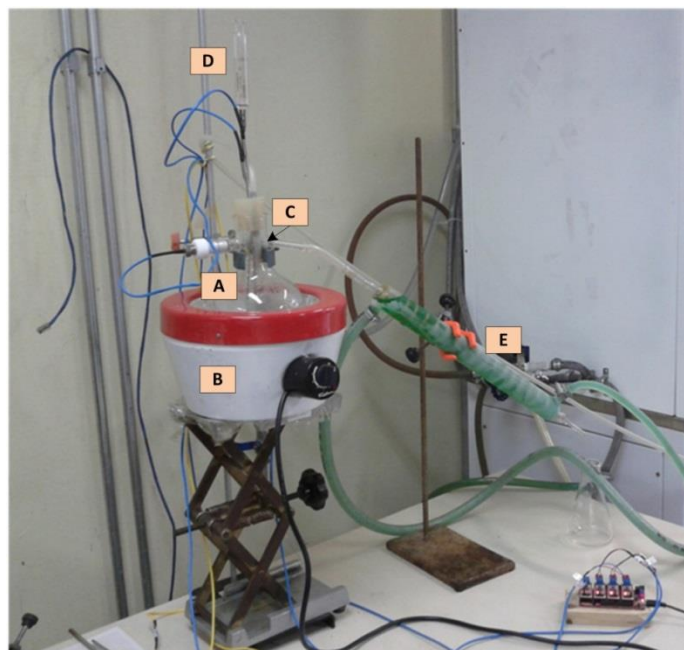


Figura 8.2: Fotografia do aparato experimental.

Na Figura 8.2 o condensador apresentado consiste em um modelo com caminho em espiral para o vapor, em contracorrente com uma solução de etilenoglicol a -12°C . Esta temperatura negativa foi empregada nos experimentos com CO₂ para a devida condensação, pois foi observado experimentalmente que a 0°C o vapor não condensava completamente.

Já para os experimentos sem a injeção de CO₂, foi utilizado um condensador diferente, de caminho reto para o vapor, no entorno do tubo havia um espaço para o acondicionamento de gelo, então a condensação foi realizada a 0°C . Nestes experimentos a temperatura de 0°C foi a mais adequada, pois a -12°C a mistura congelava.

Para o ajuste da vazão de CO₂ foi utilizada uma válvula de controle, modelo FMA da Omega com capacidade máxima de 10 L/min, para permitir um melhor controle da vazão optou-se por utilizar a vazão máxima experimental de 9 L/min. A vazão ajustada se refere às condições na CNTP. A injeção de CO₂ foi realizada através de uma mangueira de silicone conectada a uma pedra porosa na extremidade para difundir o gás no centro do balão.

Como a análise das condições de equilíbrio se dá em frações molares, nos experimentos com CO₂ o tempo de amostragem do condensado foi cronometrado, assim o volume de CO₂ foi estimado através vazão estabelecida, o número de moles deste gás foi calculado considerando as condições CNTP e a equação de gás ideal. Os moles de água e etanol foram calculados considerando o volume de condensado recolhido, as densidades de cada componente e as frações molares medidas experimentalmente. Desta forma, determinados os números de moles de cada componente na fase vapor, pode-se calcular as respectivas frações molares.

Os experimentos foram realizados uma única vez, considerando dois pontos: (i) estes experimentos consistem no primeiro estudo experimental da pesquisa, objetivando um melhor entendimento do comportamento do sistema, (ii) embora ocorram erros experimentais em cada ponto de amostragem, como são recolhidos vários pontos de um mesmo experimento é possível estimar a tendência da curva.

Sobre a obtenção do vinho, o experimento foi realizado conforme consta em Schweinberger *et al.* (2016). A batata doce com casca foi pré-aquecida a 76°C, em seguida foi realizada a trituração e adição de água (a relação batata: água foi de 1,5 kg: 1 L). O processo de hidrólise foi conduzido simultaneamente com a fermentação, durante 19h a 34°C e pH 4. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers, os quais foram colocados em incubadora a ar sob a agitação orbital de 175 rpm.

A mistura enzimática comercial Stargen 002 (produzida pela Du Pont) foi utilizada para a hidrólise. Para a degradação de substâncias pécticas, contribuindo para reduzir a viscosidade do mosto, foi usada a enzima Pectinex Ultra AFP, produzida pela Novozymes. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Angel Thermal Resistance Alcohol) produzida pela Angel foi adicionada na fermentação. Para evitar a contaminação bacteriana o antibiótico doxiciclina foi utilizado. As dosagens por massa de batata-doce foram: Stargen 002 1 µL/g, Pectinex Ultra AFP 0,1 µL/g, levedura 3,33 mg/g e doxiciclina 0,28 mg/g.

8.3 Resultados

8.3.1 Implementação do modelo

Para verificar a implementação do modelo, a simulação do equilíbrio líquido-vapor (ELV) apenas de etanol-água foi comparada com dados experimentais encontrados na literatura (Geankoplis, 2003) e o resultado é apresentado na Figura 8.3. Pode-se ver que o comportamento da curva foi bem caracterizado pelo modelo, seguindo adequadamente os pontos experimentais.

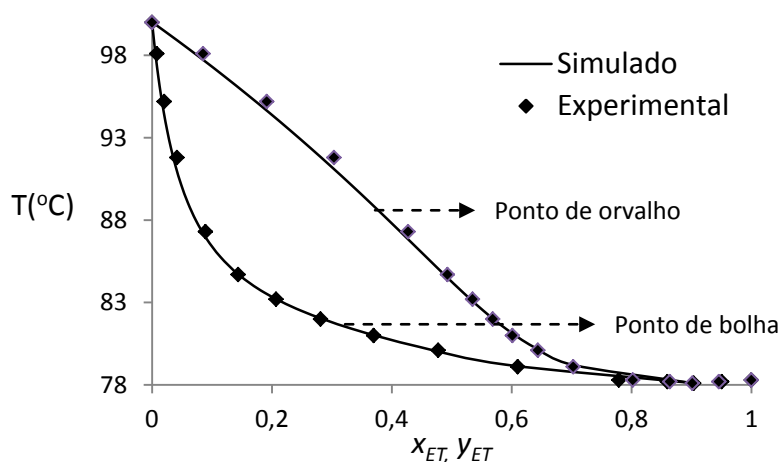


Figura 8.3: Comparação entre o modelo implementado com dados experimentais encontrados em Geankoplis (2003), x e y estão em frações molares.

Verificada a curva de etanol-água, CO_2 foi adicionado à mistura. Observou-se que, ao aumentar a concentração de CO_2 a temperatura de mudança de fase reduziu, como pode

ser visto na Figura 8.4. A Figura 8.4 foi construída a fim de demonstrar o efeito do CO₂ sobre a curva ELV, à medida que o y_{CO_2} aumenta se verifica um estreitamento das curvas. Isso é de se esperar, porque $y_{ET} = 1 - y_{CO_2} - y_{H_2O}$, por isso, se y_{CO_2} aumenta então y_{ET} reduz.

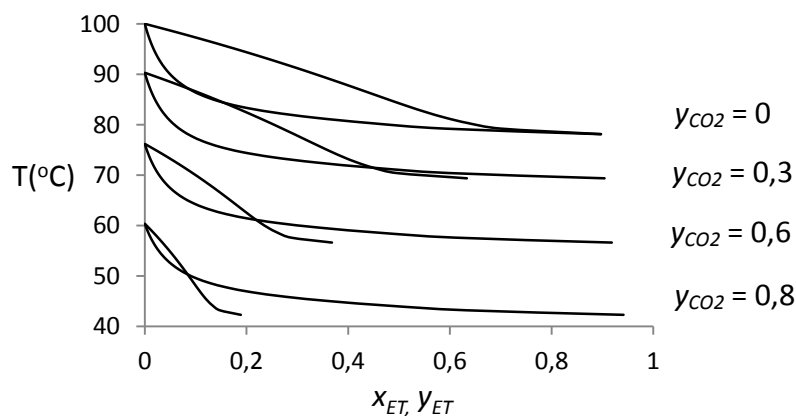


Figura 8.4: Curvas de ELV para quatro frações molares de CO₂ no vapor.

Outra constatação interessante na simulação foi que o emprego de CO₂ elevou y_{ET} no ponto azeotrópico (Figura 8.5), indicando que a separação pode ser facilitada neste aspecto. Pois, maiores concentrações de etanol podem ser atingidas antes de se chegar no ponto azeotrópico, que quando alcançado exige um maior consumo de energia para a separação. Deve-se ressaltar que, na análise da Figura 8.5, y_{ET} foi calculado como sendo a fração da mistura etanol-água, admitindo que em um processo hipotético o CO₂ foi removido do vapor em etapa anterior.

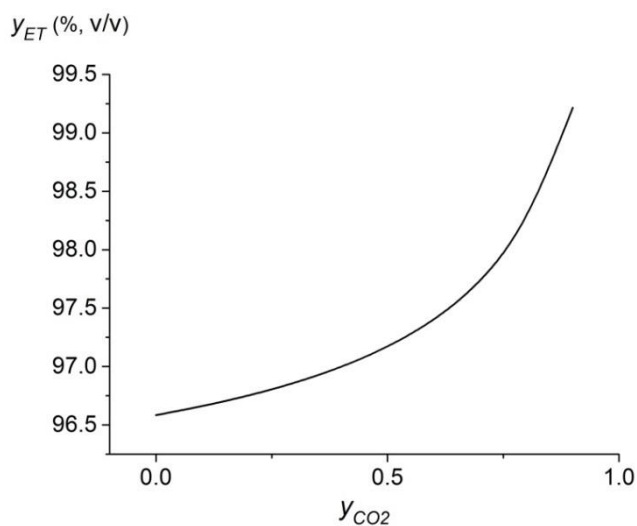


Figura 8.5: Adição de CO₂ e resultados sobre y_{ET} no ponto azeotrópico.

8.3.2 Resultados experimentais

O primeiro experimento consistiu na análise da mistura etanol-água, a fim de verificar os pontos gerados pelo aparato experimental deste estudo e a adequação ao modelo teórico, sendo o resultado apresentado na Figura 8.6, com referência às medições de

temperatura nos três pontos: fundo, interface e topo (junto à saída do vapor). Na Figura 8.7 é apresentada a evolução da temperatura nos três pontos de medição ao longo do experimento, onde os pontos experimentais estão conectados por uma linha, com o propósito de facilitar o acompanhamento dos comportamentos. Assim, a junção dos pontos com linhas também foi empregada nos demais gráficos que são apresentados na sequência.

Conforme a Figura 8.6, observa-se que a medição da temperatura no topo resultou na melhor adequação à curva teórica, obtendo-se os melhores resultados para a composição do líquido do que para o vapor.

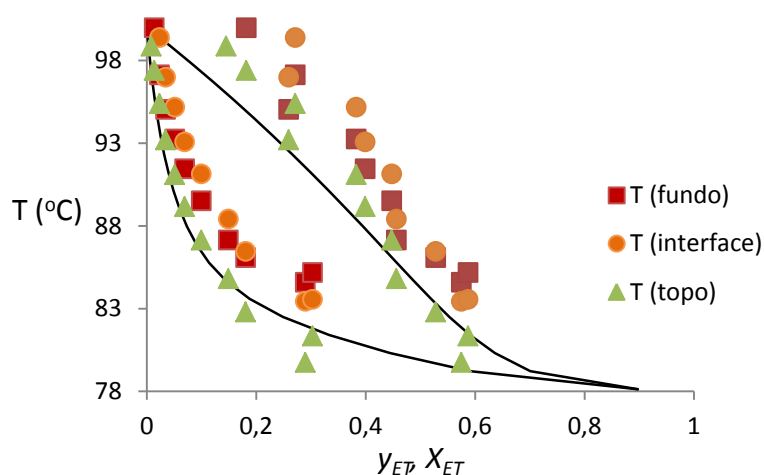


Figura 8.6: Mistura etanol-água, comparação entre os pontos experimentais produzidos neste estudo com a curva teórica.

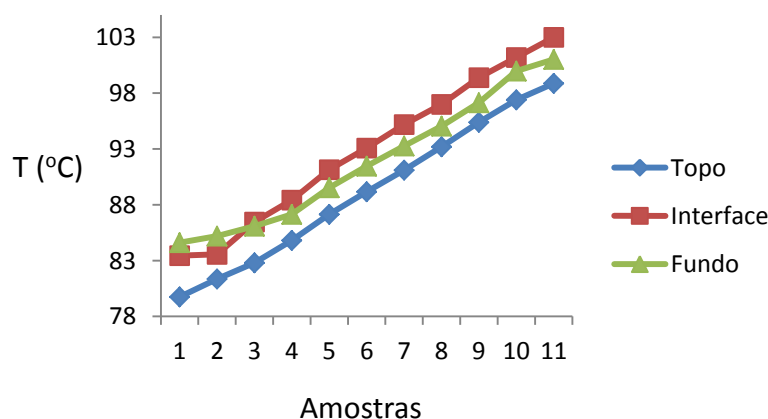


Figura 8.7: Medições de temperaturas no experimento com a mistura etanol-água.

Durante o experimento foi observada a formação de gotas estáticas no percurso da condensação (Figura 8.8), portanto, acredita-se que este fato seja um dos responsáveis pela maior variação experimental na composição do vapor. Devido à formação de gotas de concentrações diferentes, o vapor ao passar por elas pode ter sua composição alterada.



Figura 8.8: Imagem da formação de gotas no percurso da condensação.

Sobre os experimentos com a mistura água-etanol-CO₂, foi observada uma tendência de elevação da temperatura do topo à medida que se aumentou a vazão de CO₂, conforme pode ser visto na Figura 8.9. Estipulou-se o início da amostragem em temperaturas no entorno de 40°C, pois, como pode ser observado na Figura 8.4, tal temperatura corresponde à condição de equilíbrio em uma elevada concentração de CO₂ ($y_{CO_2} \sim 0,8$). O encerramento da amostragem foi determinado quando o nível de líquido no balão estava próximo de zero.

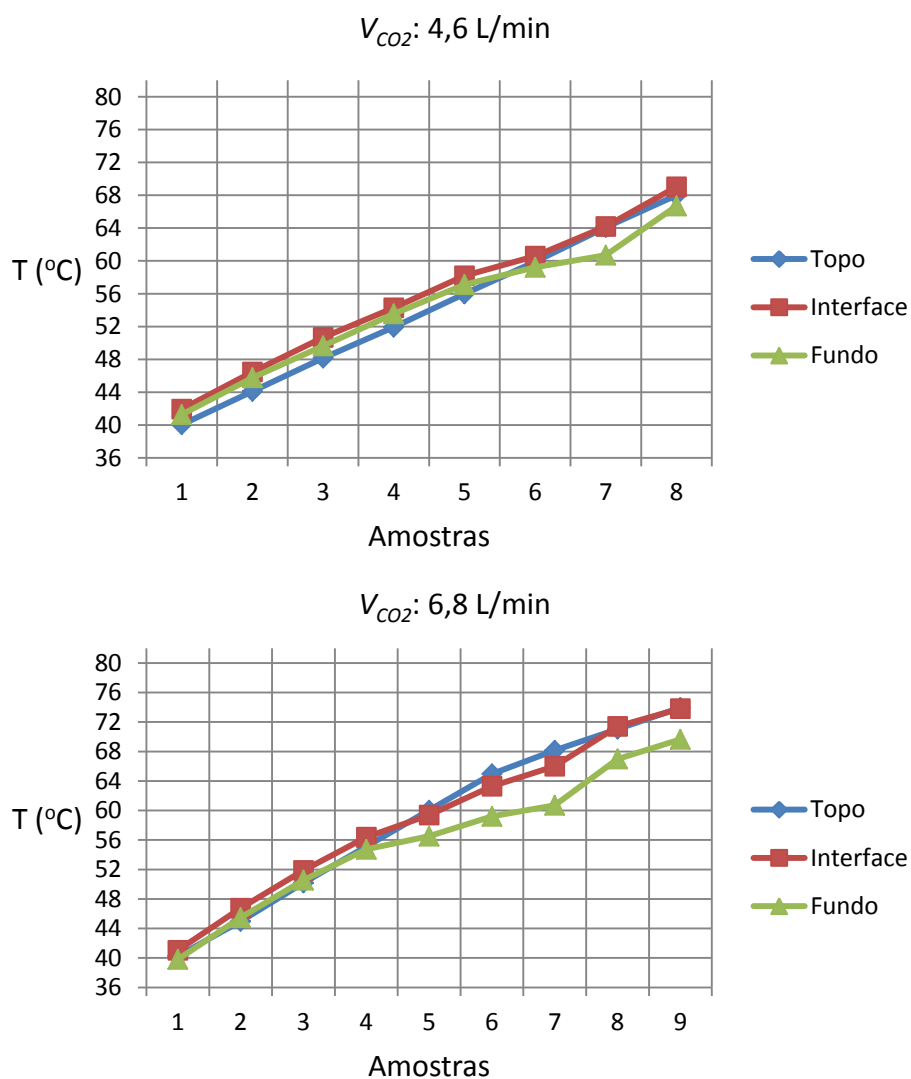


Figura 8.9: Evolução da temperatura ao longo dos experimentos, em três vazões distintas de CO₂ na mistura etanol-água-CO₂.

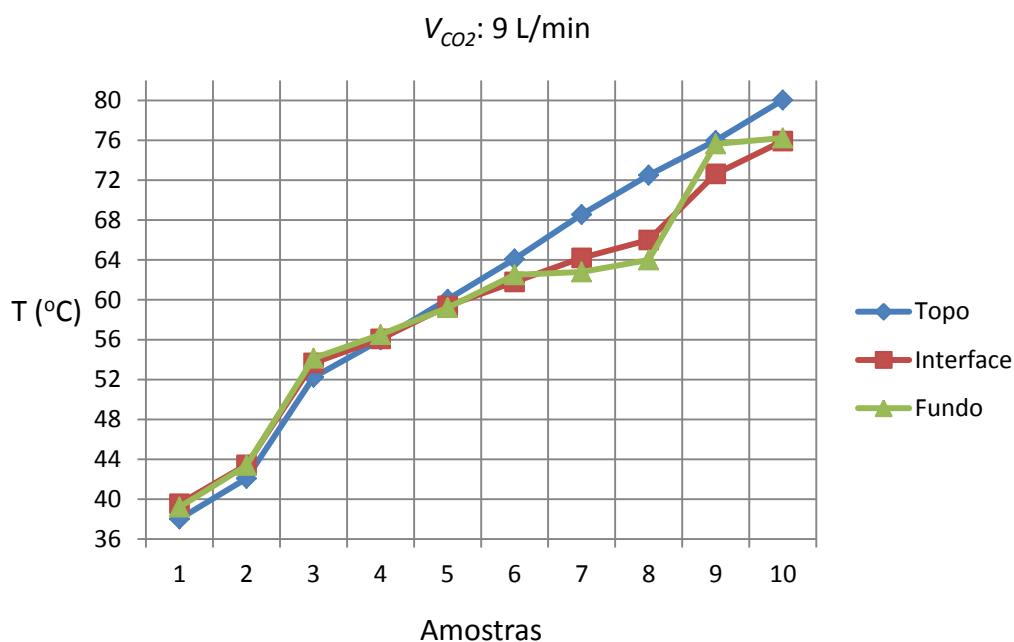


Figura 8.9 (continuação): Evolução da temperatura ao longo dos experimentos, em três vazões distintas de CO_2 na mistura etanol-água- CO_2 .

Após os experimentos, as frações molares experimentais foram calculadas conforme descrito na metodologia. Os valores experimentais das temperaturas e de y_{CO_2} foram inseridos no modelo de equilíbrio implementado, então se obteve $x_{ET(modelo)}$ e $y_{ET(modelo)}$, que puderam ser comparados com os dados experimentais ($x_{ET(exp.)}$ e $y_{ET(exp.)}$), conforme consta nas tabelas: Tabela 8.5, Tabela 8.6 e Tabela 8.7. Em tais tabelas, para uma ideia da magnitude da temperatura de cada ponto, é apresentada a temperatura média entre os três pontos de amostragem.

Observa-se nas Tabela 8.5, Tabela 8.6 e Tabela 8.7 que os valores experimentais ficaram distantes dos previstos pelo modelo, podendo-se afirmar que o modelo não representou o processo. De qualquer forma, em tais tabelas, os valores do modelo mais próximos dos experimentais estão destacados em negrito.

Provavelmente, a maior razão para a diferença teórico-experimental se deve ao arraste de líquido pela vazão de CO_2 , fenômeno que não foi previsto pelo modelo. Para atingir-se o equilíbrio o processo deveria ser mais lento, o que não ocorreu devido à elevada vazão de CO_2 . Sendo assim, os resultados deste trabalho evidenciam tal lacuna que deve ser aprimorada na modelagem.

Contudo, os resultados destes experimentos confirmaram redução da temperatura de mudança de fase, conforme já previsto teoricamente. Mas, o ponto mais positivo nos resultados deste estudo é que se conseguem maiores concentrações de etanol no condensado nas menores vazões de CO_2 .

Tabela 8.5: Comparações entre resultados experimentais com os calculados com o modelo - $V_{CO_2} = 4,6$ L/min.

$T_{média}$ (°C)	y_{CO_2}	$X_{ET(exp.)}$	$X_{ET(modelo)}$			$y_{ET(exp.)}$	$y_{ET(modelo)}$		
			T_{topo}	$T_{interface}$	T_{fundo}		T_{topo}	$T_{interface}$	T_{fundo}
41,1	0,90	0,347	0,041	0,023	0,029	0,067	0,030	0,021	0,024
45,4	0,86	0,370	0,079	0,045	0,053	0,098	0,059	0,046	0,050
49,5	0,83	0,333	0,072	0,040	0,051	0,121	0,069	0,052	0,059
53,3	0,76	0,326	0,138	0,078	0,093	0,167	0,118	0,098	0,104
57,1	0,74	0,292	0,077	0,047	0,060	0,181	0,106	0,085	0,095
59,9	0,76	0,179	0,020	0,016	0,025	0,141	0,048	0,042	0,055
63,0	0,78	0,085	Obs. 1	Obs. 1	0,008	0,100	Obs. 1	Obs. 1	0,022
67,9	0,82	0,024	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1	0,032	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1

Obs. 1: Não houve condição de equilíbrio para o modelo em tais pontos.

Tabela 8.6: Comparações entre resultados experimentais com os calculados com o modelo - $V_{CO_2} = 6,8$ L/min.

$T_{média}$ (°C)	y_{CO_2}	$X_{ET(exp.)}$	$X_{ET(modelo)}$			$y_{ET(exp.)}$	$y_{ET(modelo)}$		
			T_{topo}	$T_{interface}$	T_{fundo}		T_{topo}	$T_{interface}$	T_{fundo}
40,4	0,905	0,262	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1	0,054	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1
45,7	0,861	0,274	0,055	0,035	0,049	0,078	0,049	0,039	0,046
50,9	0,819	0,280	0,054	0,036	0,050	0,102	0,063	0,051	0,061
55,4	0,726	0,234	0,125	0,092	0,137	0,151	0,131	0,119	0,135
58,7	0,745	0,161	0,028	0,033	0,064	0,114	0,063	0,069	0,096
62,5	0,776	0,096	Obs. 1	Obs. 1	0,016	0,090	Obs. 1	Obs. 1	0,037
65,0	0,743	0,057	Obs. 1	Obs. 1	0,024	0,087	Obs. 1	Obs. 1	0,058
69,8	0,774	0,021	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1	0,045	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1
72,5	0,679	0,004	Obs. 1	Obs. 1	0,004	0,023	Obs. 1	Obs. 1	0,019

Obs. 1: Não houve condição de equilíbrio para o modelo em tais pontos.

Tabela 8.7: Comparações entre resultados experimentais com os calculados com o modelo - $V_{CO_2} = 9$ L/min.

$T_{média}$ (°C)	y_{CO_2}	$X_{ET(exp.)}$	$X_{ET(modelo)}$			$y_{ET(exp.)}$	$y_{ET(modelo)}$		
			T_{topo}	$T_{interface}$	T_{fundo}		T_{topo}	$T_{interface}$	T_{fundo}
38,9	0,920	0,274	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1	0,049	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1
43,0	0,890	0,234	0,037	0,025	0,026	0,061	0,031	0,025	0,025
53,3	0,794	0,203	0,061	0,044	0,039	0,118	0,076	0,065	0,061
56,2	0,729	0,188	0,095	0,093	0,084	0,149	0,119	0,118	0,114
59,5	0,758	0,157	0,021	0,025	0,026	0,125	0,049	0,055	0,057
62,8	0,714	0,117	0,018	0,033	0,028	0,136	0,053	0,079	0,071
65,2	0,699	0,089	0,003	0,024	0,035	0,124	0,013	0,068	0,085
67,5	0,651	0,019	0,001	0,035	0,054	0,045	0,007	0,099	0,123
74,8	0,609	Obs. 2	Obs. 1	0,011	Obs. 1	0,014	Obs. 1	0,050	Obs. 1
77,4	0,659	0,007	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 1	Obs. 1	Obs. 1

Obs. 1: Não houve condição de equilíbrio para o modelo em tais pontos.

Obs. 2: Nestes pontos as amostras foram perdidas.

O perfil da composição de etanol vs. temperatura pode ser visto na Figura 8.10 e Figura 8.11 (é mostrada a temperatura média dos três pontos de medição para facilitar a visualização). Na Figura 8.10 é apresentada a fração molar y_{ET} considerando os três componentes no vapor (y_{ET} , y_{H_2O} e y_{CO_2}). y_{ET} apresentou valores baixos porque y_{CO_2} ficou na ordem de grandeza 0,6 – 0,9 (conforme pode ser visto nas tabelas: Tabela 8.5, Tabela 8.6 e Tabela 8.7). O interessante nesta análise é que se observa a existência de um máximo nas curvas. Na Figura 8.11 são apresentadas as composições x_{ET} e y_{ET} , desprezando a fração molar de CO_2 . Na fase líquida a fração de CO_2 já é desprezível e, na fase gasosa, foi calculada a composição do condensado, que é essencialmente água e etanol (sendo a quantidade de CO_2 dissolvida também desprezível). Pode-se concluir através da Figura 8.11 a possibilidade de uma separação satisfatória a baixas temperaturas, a exemplo na vazão de CO_2 de 4,6 L/min (onde se obtém as maiores concentrações de etanol no vapor), na temperatura de 41°C $y_{ET} = 0,67$ e $x_{ET} = 0,35$, resultando em uma volatilidade relativa de 3,77.

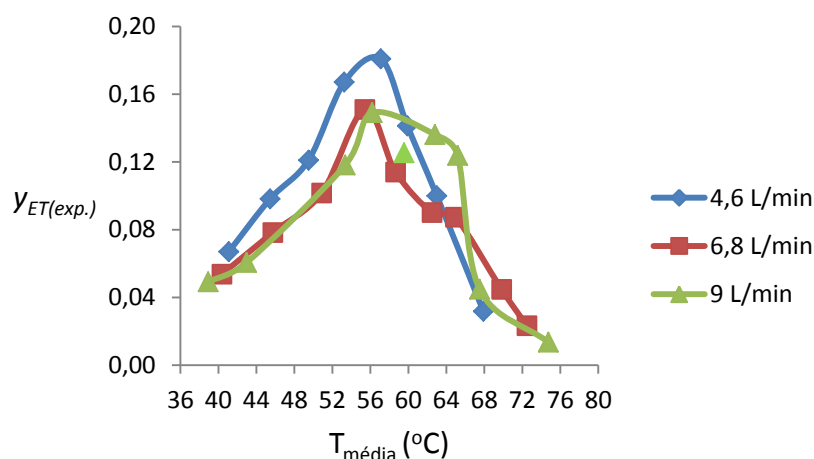


Figura 8.10: Frações molares de etanol considerando a mistura ternária: etanol-água- CO_2 , nas três condições distintas de vazão de CO_2 . Por ter ficado fora do comportamento, o ponto (59,5; 0,13) da vazão de 9 L/min não foi conectado.

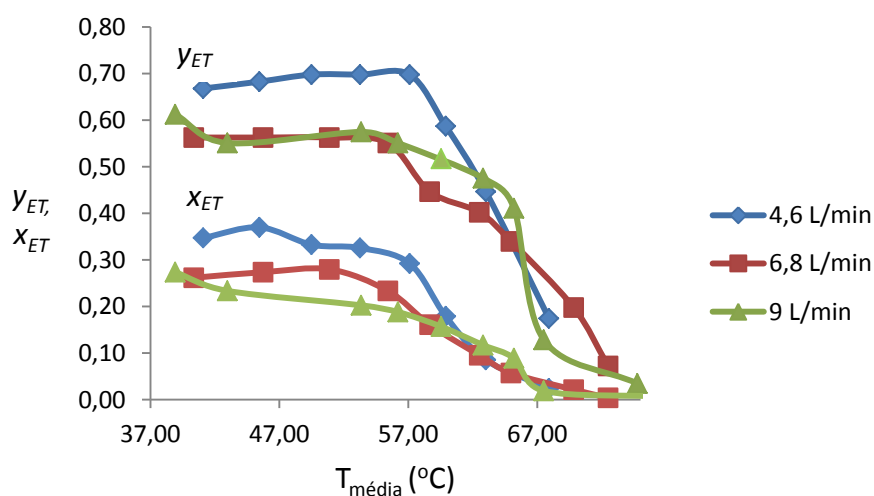


Figura 8.11: Frações molares de etanol no experimento etanol-água- CO_2 , mas desconsiderando a fração molar de CO_2 (dados nas três vazões de CO_2).

Sobre os experimentos com vinho de batata-doce, na Figura 8.12 são apresentados os gráficos de evolução das temperaturas nas três condições experimentais estudadas. No experimento com somente vinho o comportamento das temperaturas foi semelhante ao observado para a mistura etanol-água (Figura 8.7), com a temperatura do topo sendo inferior e a temperatura na interface predominantemente superior.

Com relação aos experimentos com injeção de CO₂ no vinho de batata-doce, pode-se observar um comportamento diferente nas temperaturas em relação aos experimentos com etanol-água-CO₂, enquanto que nestes últimos se percebe uma tendência de redução na temperatura do fundo em relação aos outros dois pontos (à medida que as temperaturas aumentam), nos experimentos com vinho se observa o contrário. Com os resultados destes experimentos não é possível identificar o motivo específico de tal comportamento diferente, mas possivelmente a razão reside na complexidade da composição do vinho. Na Figura 8.13 são apresentadas imagens do aspecto do vinho antes e após o experimento.

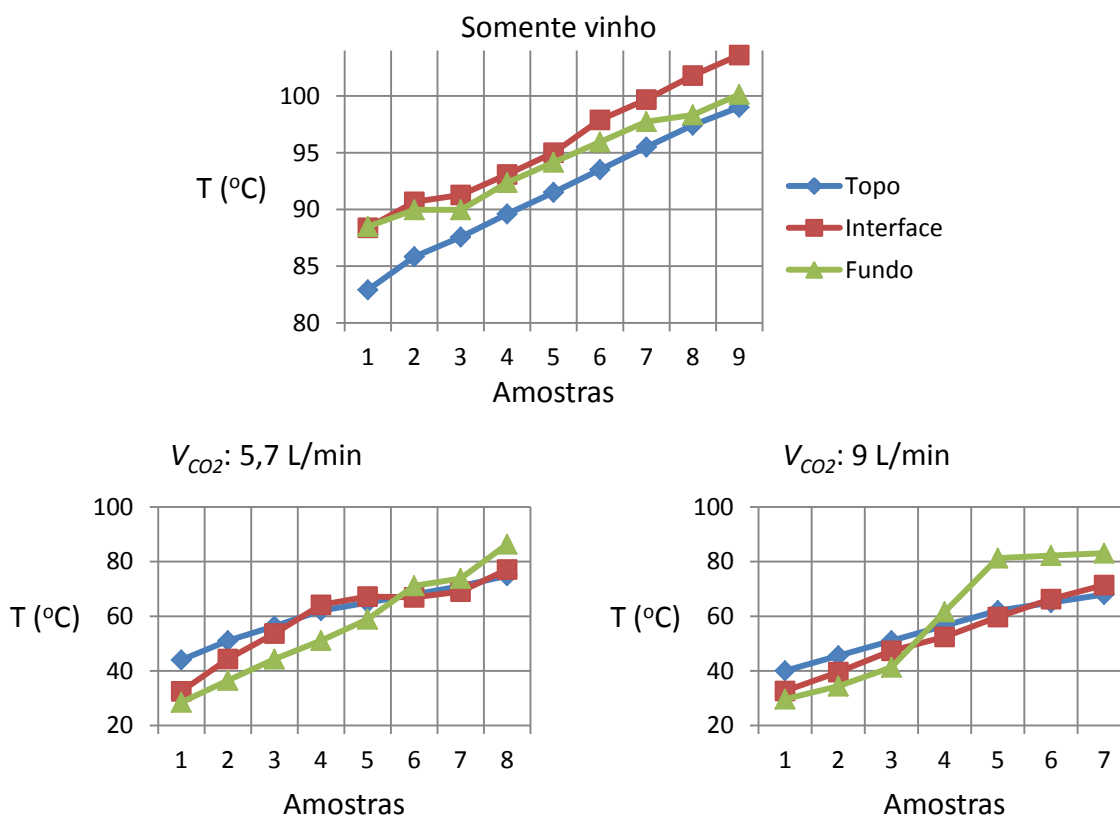


Figura 8.12: Gráficos sobre a evolução da temperatura ao longo dos experimentos com vinho de batata-doce.



Antes



Após

Figura 8.13: Vinho de batata-doce, antes do experimento de destilação e após.

Salienta-se que nos experimentos com o vinho apenas amostras do condensado foram coletadas, devido à viscosidade e fragmentos sólidos no líquido a sua amostragem pela seringa se tornou inviável.

No que se refere ao comportamento composição x temperatura nos experimentos com o vinho, na Figura 8.14 é apresentada a fração molar y_{ET} considerando os três componentes no vapor (y_{ET} , y_{H_2O} e y_{CO_2}), observa-se um perfil semelhante ao visto nos experimentos etanol-água- CO_2 (Figura 8.10). Mas, a magnitude de y_{ET} no vinho foi menor, nisto se deve recordar que no vinho se partiu com uma concentração inferior de etanol (25% v/v para o vinho e 67% para a mistura etanol-água- CO_2), também, outro fator importante a mencionar é a viscosidade do vinho, que oferece maior resistência ao escoamento do CO_2 e vaporização do líquido.

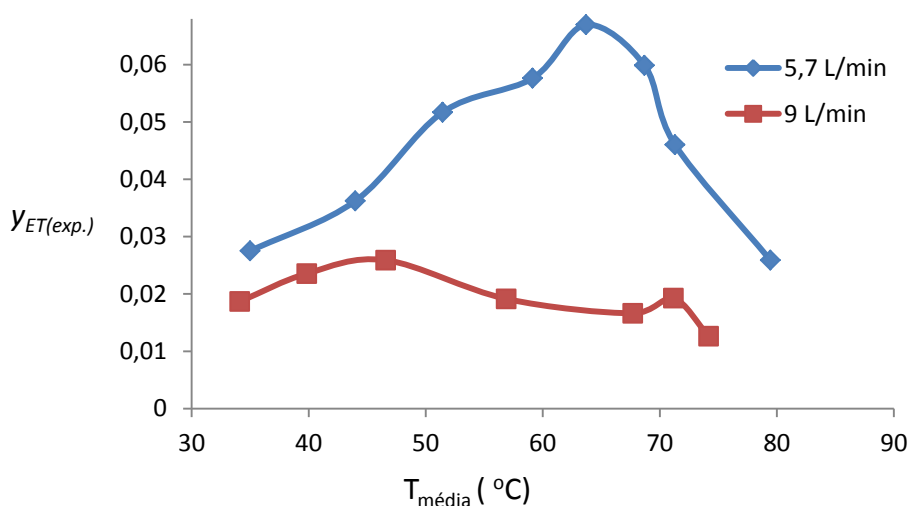


Figura 8.14: Resultado dos experimentos com vinho com duas vazões distintas de CO_2 , a fração molar y_{ET} é apresentada considerando os três componentes no vapor (y_{ET} , y_{H_2O} e y_{CO_2}).

A Figura 8.15 apresenta os resultados do vinho desprezando a fração molar de CO_2 , ou seja, essencialmente a composição do condensado.

Na Figura 8.15 também é apresentado o resultado do experimento com apenas o vinho (sem injeção de CO_2), o interessante é que os resultados experimentais ficaram bastante próximos da curva teórica de equilíbrio (região linear do vapor, Figura 8.3), principalmente quando se considera as temperaturas medidas no topo, por esta razão na Figura 8.15 consta adicionalmente os resultados em tal condição.

Por fim, é importante comentar sobre o tempo do processo, que é uma variável importante de ser acompanhada. O tempo não foi cronometrado em todos os experimentos. Mas, para ter-se uma ideia, no experimento com apenas o vinho de batata-doce o tempo foi de 1h 56 min, e no experimento do vinho com a vazão de CO_2 de 5,7 L/min o tempo foi de 57 min, ou seja, a metade do tempo em relação quando foi utilizado apenas o vinho.

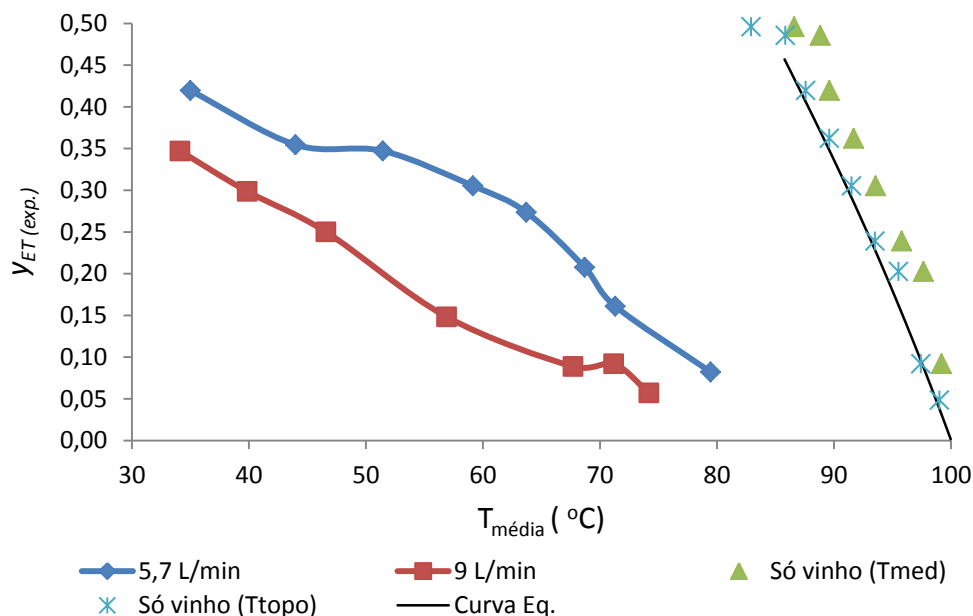


Figura 8.15: Frações molares y_{ET} nos experimentos com vinho, mas desconsiderando a fração molar de CO₂.

8.4 Conclusões

Conforme previsto, os resultados deste estudo confirmaram a redução na temperatura de evaporação ao se injetar CO₂, o que pode ser positivo na redução do consumo energético na recuperação do etanol. Por outro lado, viu-se que o emprego do CO₂ implicou em uma maior dificuldade de condensação, nos experimentos foi utilizada uma temperatura de -12°C para o fluido de refrigeração, por facilitar o procedimento experimental. Contudo, em um processo industrial, pode-se cogitar temperaturas de ~ 20°C para a água de refrigeração, que é dez graus abaixo da menor temperatura de condensação da mistura vinho-CO₂, salientado que neste caso o projeto do trocador de calor deve ser adequado para garantir uma condensação satisfatória.

Portanto, é importante um futuro estudo comparando o processo convencional com a injeção de CO₂, considerando todas as entradas e saídas energéticas, para então se verificar se no balanço global de energia o saldo é mais favorável ao emprego do CO₂, pois o sistema com CO₂ haveria o diferencial do consumo energético devido ao reciclo do CO₂, envolvendo um sistema de compressão. Também, é importante que seja realizada uma análise financeira comparativa, pois o sistema com CO₂ teria o custo de investimento com uma coluna de diâmetro maior, com o sistema de compressão mencionado anteriormente e com o vaso de armazenamento de CO₂.

Contudo, a análise global energética e financeira deve ser realizada sobre a melhor condição operacional do processo. Por isto, deve-se continuar o estudo objetivando uma melhor caracterização termodinâmica e fenomenológica do sistema.

Viu-se que o comportamento da mistura etanol-água-CO₂ não se adequou ao predito pelo modelo teórico implementado, atribui-se que o maior motivo para isto seja que o sistema não chegou a atingir o equilíbrio. Contudo, os resultados experimentais

mostraram que se conseguem maiores concentrações de etanol no condensado nas menores vazões de CO₂.

Os resultados apresentados neste artigo são os primeiros do estudo experimental desenvolvido no GIMSCOP. Sabe-se da importância da realização de mais experimentos com menores vazões de CO₂, incluindo condições nas quais o equilíbrio seja alcançado, onde ao aumentar a abrangência experimental se possa encontrar a melhor vazão operacional, sendo no equilíbrio ou não.

Porém, antes que mais experimentos sejam realizados, o aparato experimental deve ser aperfeiçoado, ou substituído, de modo a reduzir as fontes de erros. No dispositivo utilizado foi visto o ponto negativo da condensação no percurso do vapor (Figura 8.8). Adicionalmente, a estimativa de y_{CO_2} com o método de cronometragem da amostragem e cálculo considerando a vazão nominal pode ter sido uma fonte de erro relevante. Sugere-se que determinação de y_{CO_2} seja aprimorada com a medição experimental da vazão, temperatura e pressão do CO₂ na entrada do recipiente que condiciona a mistura.

Para a reformulação ou substituição do aparato experimental, é interessante considerar outros dispositivos mais complexos, fabricados especificamente para a determinação de condições de equilíbrio, como o ebuliômetro de Fischer. O princípio deste equipamento envolve o contato íntimo entre as fases, que recirculam continuamente, e quando não se registra mais variação sensível na temperatura por um período de pelo menos 30 minutos é assumido o equilíbrio, então as amostras são recolhidas (Oliveira, 2003).

Sobre outras questões para futuros trabalhos, como se observou comportamentos diferentes entre as misturas etanol-água-CO₂ e o vinho, é recomendável que o foco nos próximos estudos seja no vinho, dado que é a mistura a implementar em um processo real.

8.5 Referências

BRASIL. **Resolução ANP Nº 19**. 2015.

DALMOLIN, I. *et al.* Solubility of carbon dioxide in binary and ternary mixtures with ethanol and water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 245, n. 2, p. 193-200, 8/10/ 2006. ISSN 0378-3812. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381206002020> >.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and separation process principles: includes unit operations**. 4. Upper Saddle River, N.J: Prentice Hall PTR, 2003.

HASHI, M.; TEZEL, F. H.; THIBAUT, J. Ethanol recovery from fermentation broth via carbon dioxide stripping and adsorption. **Energy and Fuels**, v. 24, n. 9, p. 4628-4637, 2010. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77956730934&partnerID=40&md5=47d2a8d7afe3792c7bcf1f94115fba10> >.

MASIERO, S. S. **Microusinas de etanol de batata-doce: viabilidade econômica e técnica**. Porto Alegre: Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2012.

OLIVEIRA, H. N. M. D. **Determinação de dados de Equilíbrio Líquido-Vapor para Sistemas Hidrocarbonetos e Desenvolvimento de uma nova Célula Dinâmica**. Natal: Tese de doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), 2003.

PERRY, R.; GREEN, D. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 8. McGraw-Hill Education, 2007.

PHAM, C. B. *et al.* Simultaneous ethanol fermentation and stripping process coupled with rectification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 1, p. 25-31, 1989. ISSN 0922-338X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0922338X89902092> >.

PINTO, C. R. D. S. **Remoção de etanol por stripping empregando dióxido de carbono**: Dissertation, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2014.

POLING, B. E.; PRAUSNITZ, J. M.; O'CONNELL, J. P. **The properties of gases and liquids**: McGraw-Hill, 2001.

PONCE, G. H. S. F. *et al.* Simulation, Analysis and Optimization of an In Situ Gas Stripping Fermentation Process in a Laboratory Scale for Bioethanol Production **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, 2014.

SATO, K. *et al.* Pilot-scale solid-state ethanol fermentation by inert gas circulation using moderately thermophilic yeast. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, n. 2, p. 173-180, 1988. ISSN 0385-6380. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0385638088900441> >.

SCHWEINBERGER, C. M. *et al.* Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods, and cost analysis. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 2016. ISSN 1939-019X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.22441> >.

SIDOU, P. N. **Estudo do Efeito do CO₂ na Destilação em Batelada da Mistura Etanol-Água**. Porto Alegre: Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2014.

SONEGO, J. L. S. *et al.* Extractive batch fermentation with CO₂ stripping for ethanol production in a bubble column bioreactor: Experimental and modeling. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 12, p. 7552-7559, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84918827307&partnerID=40&md5=6b0f51f2385ce5c2aad02e1542683daa> >.

TAYLOR, F. *et al.* Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4403-4408, 6// 2010. ISSN

0960-8524. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410001781> >.

VOUTSAS, E. C. *et al.* Measurements and thermodynamic modeling of the ethanol–water system with emphasis to the azeotropic region. **Fluid Phase Equilibria**, v. 308, n. 1–2, p. 135-141, 9/25/ 2011. ISSN 0378-3812. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381211002688> >.

ZHANG, J.; LIU, H. J.; LIU, D. H. Effect of different types of gas in gas stripping ethanol fermentation (GSEF). **Guocheng Gongcheng Xuebao/The Chinese Journal of Process Engineering**, v. 5, n. 3, p. 349-352, 2005. Disponível em: <
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-21144452419&partnerID=40&md5=06c05abe5ee3137c115e13b09e7c3654> >.

PARTE IV

O modelo de biorrefinarias de batata-doce e projeção de cenários

Capítulo 9 – Batata-doce: uma opção para a produção de etanol no RS

De todo etanol consumido no RS, menos de 2% é produzido no Estado (UNICA, 2016), devendo o restante ser importado dos demais Estados brasileiros. Para que o RS alcance autonomia em relação a esse combustível, deve-se ter disponibilidade suficiente de matéria-prima. A cana-de-açúcar é uma opção, mas deve passar por processo de melhoramento para que tenha uma produção satisfatória no Estado, pois as condições climáticas gaúchas não favorecem o cultivo dessa cultura.

Já a batata-doce é uma cultura interessante, onde o RS lidera a produção nacional, detendo em torno de 30% da produção brasileira (IBGE, 2016). Além do mais, a batata-doce possui as vantagens agrícolas de que cresce em solos pobres, é resistente à seca, possui alta taxa de multiplicação, baixa incidência de doenças e pragas e ciclo curto de crescimento (4 a 6 meses), enquanto a cana requer 12 meses.

Na cana-de-açúcar, o substrato convertido em etanol é a sacarose: uma tonelada de cana produz entre 85 – 90 litros de etanol (Nova Cana, 2016). No caso da batata-doce, é o amido o principal substrato convertido em etanol. Por ser rica em amido, com a batata-doce é possível a obtenção de elevados rendimentos de etanol. Contudo, como existe uma significativa variabilidade no teor de amido entre as diferentes origens de batata-doce, na Tabela 9.1 são apresentados alguns cenários para diferentes teores de amido.

Tabela 9.1: Rendimentos e quantidades de batata-doce para a micro-usina considerando a produção de 1000 L de etanol hidratado combustível.

Amido (%)	Rendimento (L/t)	Quantidade de batata-doce (t) para a micro-usina	Custo de produção (R\$/L)
20	137,6	7,27	1,64
25	171,8	5,82	1,49
30	206,2	4,85	1,39
35	240,4	4,16	1,31

Visando a viabilização técnica e financeira da produção de etanol a partir da batata-doce, no ano de 2011 foram iniciados experimentos no grupo GIMSCOP do Departamento

de Engenharia Química da UFRGS. Os dados apresentados na Tabela 9.1 são baseados nos últimos resultados da pesquisa que tem sido desenvolvida no GIMSCOP, onde se considera 90% de eficiência global no processo industrial.

9.1 Modelo Descentralizado de Produção

A pesquisa do GIMSCOP é direcionada para o modelo descentralizado de produção, onde o etanol é processado em pequenas unidades. As vantagens deste modelo em relação ao centralizado são: redução de custos logísticos; aproveitamento do potencial das culturas regionais; redução do impacto ambiental pela diversificação de culturas; produção integrada com alimentos; e reaproveitamento de resíduos do processo nas propriedades rurais próximas. Nos estudos desenvolvidos no GIMSCOP, foi adotada para análise uma microusina com capacidade produtiva de 1000 L/dia de etanol hidratado combustível. Portanto, para uma produção fixa de 1000 L/dia, a quantidade necessária de batata varia de acordo com o teor de amido, quanto maior o teor de amido menor é a quantidade necessária de batata, como está exemplificado na Tabela 9.1.

9.2 Resultados obtidos no GIMSCOP

Apesar da superioridade da batata-doce sobre a cana-de-açúcar em termos de rendimento de etanol por tonelada, existem alguns pontos desfavoráveis. Nos processos com a cana, a fermentação encerra depois de 10 h com o teor de etanol em aproximadamente 10% em volume. Já na produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas, o tempo pode levar entre 24 – 48 h. No processo desenvolvido no GIMSCOP, com o aquecimento prévio da batata e simultaneidade de processos, conseguiu-se realizar a fermentação em 19 h, com a obtenção do teor de etanol entre 10 – 12% em volume. Portanto, consistiu em um resultado positivo reduzindo o tempo de 24 - 48 h para 19 h, mas ainda assim é superior às 10 h do processo com a cana. Entretanto, esse tempo se encaixa perfeitamente no modelo descentralizado de produção, o qual considera apenas uma jornada de trabalho de 8 horas. Esse tempo permite que a dorna de fermentação possa produzir etanol todos os dias, levando a uma baixa ociosidade do equipamento. O modelo desenvolvido, foi concebido para 8 dornas produzindo cada uma 125 L de etanol dia, sendo que cada dorna é processada sequencialmente em ciclos de carga, fermentação, descarga, limpeza e destilação. O ciclo completo de processamento total é levemente inferior a 24 horas.

Outro ponto desfavorável da produção a partir da batata-doce é a elevada quantidade de sólidos residuais. Com a cana, processa-se apenas o caldo, que é extraído do colmo. No caso da batata-doce, esta é utilizada integralmente, acarretando em sólidos no meio que podem dificultar o processo. A viscosidade e quantidade de sólidos já foram reduzidas com processos enzimáticos na pesquisa do GIMSCOP, como pode ser visto na Figura 9.1, que apresenta a diferença de um processo sem a redução e outro com.

Contudo, o processo de redução de sólidos e viscosidade ainda pode ser aprimorado, pois sempre é desejável um meio o mais fluído possível. Por exemplo, caso não seja feito algum processo para a redução do custo da levedura, este fica estimado em 35% do custo total. Uma alternativa é o reciclo da levedura, e para este processo é desejável um meio pouco viscoso e de baixo teor de sólidos.



Figura 9.1: Imagem comparativa de fermentação, sem processo de enzimático de redução de viscosidade e sólidos (a) e com (b).

Portanto, a batata-doce possui um potencial interessante para a produção de etanol no RS, melhorias já foram feitas no processo para sua viabilização, como a redução do tempo de fermentação, obtenção de teores etanol no mesmo patamar da cana (10 – 12%) e a redução dos sólidos e viscosidade. Porém, ainda existem pontos a serem aprimorados e investigados, como uma maior redução de sólidos e viscosidade, estudo sobre processos para a redução do custo da levedura, implicações na destilação e, ainda, é possível a concentração de batata no mosto visando a obtenção de vinhos mais concentrados em etanol (~15%).

9.3 Batatas de elevada produtividade

Para que a produção de etanol a partir de batata-doce seja atrativa, não só a viabilização industrial é importante, mas toda a cadeia que envolve o processo. Na esfera agrícola, é desejável o cultivo de batatas com elevada produtividade por hectare e elevado teor de amido. As produtividades médias dessa matéria-prima no país e no RS são ambas aproximadamente 13 t/ha de raízes (IBGE, 2016).

Contudo, a Embrapa Clima Temperado de Pelotas tem trabalhado com cultivares de batata-doce, selecionando-as pelo processo de limpeza clonal, obtendo como resultado são batatas com elevada produtividade. Há 9 anos atrás já tinham sido obtidos bons resultados com três cultivares: BRS Amélia, BRS Cuia e BRS Rubissol (De Castro e Becker, 2011a; b; c), e recentemente (março/2016) foi lançada a BRS Fepagro Viola, destacando-se por elevada produtividade e teor de amido (Betemps e Pinto, 2016). Na Figura 9.2 são apresentadas imagens desses quatro cultivares selecionados pela Embrapa. Na Tabela 9.2 são apresentados cenários de produção considerando tais batatas, os dados são referentes a produção diária de 1000 L de etanol hidratado combustível. Na Tabela 9.2 são consideradas duas possibilidades para as cultivares Cuia e Amélia, pois a Cuia produziu em média 40 t/ha, mas podendo atingir 60 t/ha e a cultivar Viola pode produzir entre 60 – 80 t/ha.

A Tabela 9.2 foi montada utilizando valores conservativos de produtividade documentados em trabalhos científicos, entretanto a relatos que produtividades ainda maiores tenham sido alcançadas, mas para evitar que sejam criadas expectativas demasiadamente otimistas, optou-se por não se reportar esses valores. Para se traduzir o

resultado desta tabela para uma produção anual, basta que se multiplique a área de cultivo pelo número de dias de processamento, por exemplo, se consideramos 240 dias (20 dias *12 meses) de produção anual se precisaria ter uma área plantada mínima de 21,6 ha (= 240 x0,09 ha) de batata-doce cuia ou 12 ha de Viola, caso essas produções fossem totalmente destinadas a produção de etanol. Entretanto, como será discutido na próxima seção, para aumentar o retorno econômico, há necessidade de diversificar o leque de produtos comercializados, fazendo com que apenas uma parcela (em torno de 30%) seja destinada a produção de etanol. Nestes casos as áreas plantadas subiriam respectivamente para 72 ha para a cultivar Cua e 40 ha, para Viola.

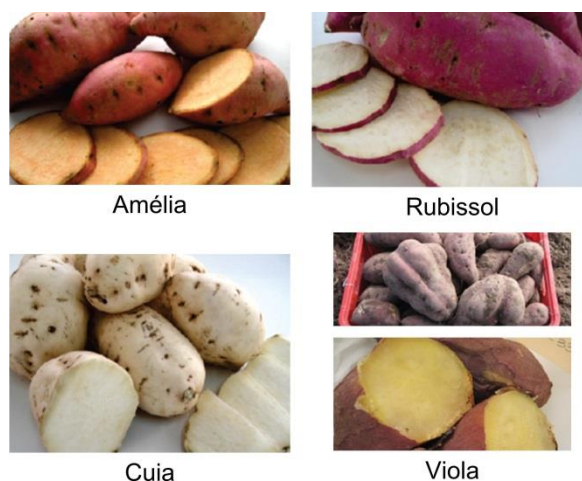


Figura 9.2: Batatas selecionadas pela Embrapa pelo processo de limpeza clonal.
 FONTE: De Castro e Becker (2011a; b; c); De Castro, Chielle e Becker (2016).

Tabela 9.2: Cenários de produção de 1000 L etanol/dia considerando as batatas melhoradas pela Embrapa.

Cultivar	Amido (%)	Produtividade (t/ha)	Quantidade	
			de batata-doce requerida (t)	Área de cultivo (ha)
Amélia	27,1	32	5,37	0,17
Cua	26,3	40	5,53	0,14
		60		0,09
Rubissol	20,6	40	7,06	0,18
Viola	35,8	60	4,06	0,07
		80		0,05

FONTE: De Castro e Becker (2011a; b; c); Betemps e Pinto (2016).

9.4 Biorrefinaria: produção integrada para a viabilidade econômica

Schweinberger (2016) avaliou os custos de produção de uma microusina onde o único produto era etanol, os fatores de maior impacto no custo final foram (supondo um reciclo

de 11 vezes da levedura): matéria-prima (29%); enzima para a hidrólise do amido (17%); mão de obra (17%); enzima para a redução da viscosidade (9,2%); eletricidade (8,7%) e; antibiótico (7,9%). Ainda, neste cenário de apenas produção de etanol a margem de lucro é estreita, que foi estimada em ~ 20%. Desta forma, o conceito de uma biorrefinaria com produção integrada merece destaque, onde a partir da batata-doce podem ser gerados diferentes produtos, aumentando a receita. No trabalho de Petterle (2015) essas questões são discutidas e diversos cenários são analisados sob o ponto de vista de viabilidade econômica envolvendo o modelo descentralizado de produção.

Não somente as raízes da batata-doce podem ser aproveitadas no beneficiamento, mas também a parte aérea que compõe a planta. Um destino mais comum é a produção de silagem para alimentação animal. Contudo, pode-se também objetivar a alimentação humana, Sun *et al.* (2014) avaliaram a composição nutricional de folhas de batata-doce, os teores de proteína e fibra bruta variaram entre 16,7-31,1 e 9,15-14,26 g/100 g de peso seco, respectivamente. De acordo com o índice de qualidade nutricional, as folhas de batata-doce são boas fontes de proteínas, fibras e minerais, especialmente K, P, Ca, Mg, Fe, Mn e Cu. Além disto, foi identificada uma significativa atividade antioxidante dos polifenóis presentes, de maneira que as folhas de batata-doce são importantes fontes destes bioativos (Sun *et al.*, 2014).

Outra oportunidade de produto consiste na torta residual da fermentação que pode ser aproveitada, inclusive na produção de alimentos de valor agregado. Considerando que a batata-doce possui baixo teor de gordura ~0,17 % (Bradbury e Holloway, 1988) e mais de 90 % dos carboidratos são convertidos na produção de etanol, os nutrientes majoritários que restam para compor a torta são fibras e proteínas. Ressaltando que, a combinação fibras + proteínas sempre é bem sucedida no segmento de alimentos “*fit*”.

Entre as possibilidades de produtos, a própria batata-doce pode ser comercializada *in natura*, bem como ser seca para produzir uma farinha integral deste tubérculo. A vantagem da diversidade de produtos é a flexibilidade na destinação da matéria-prima, as batatas com as melhores apresentações podem ser vendidas *in natura*, as demais podem ser direcionadas à produção de etanol, shochu (uma bebida destilada de batata-doce) ou farinha de batata-doce. Recordando ainda os coprodutos que podem ser gerados nesses processos, sendo da parte aérea da planta e das tortas da produção de etanol e de shochu. Além disto, a batata-doce que não vender nas gôndolas do comércio pode retornar para a produção de etanol.

9.5 Referências

BETEMPS, C.; PINTO, E. **Embrapa**. Fepagro e Embrapa lançam nova cultivar de batata-doce na Expoagro. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/10803441/fepagro-e-embrapa-lancam-nova-cultivar--de-batata-doce-na-expoagro> >. Acesso em: 11 abril 2016.

BRADBURY, J. H.; HOLLOWAY, W. D. Chemistry or Tropical Root Crops: significance for nutrition and agriculture in the Pacific. **ACIAR Monograph No. 6**. Melbourne: Ramsay Ware Printing, 1988.

NOVA CANA. Curiosidades sobre o etanol. Disponível em: < <https://www.novacana.com/etanol/curiosidades/> >. Acesso em: 10 abril 2016.

DE CASTRO, L. A. S.; BECKER, A. **Batata-doce BRS Amélia**. Pelotas: Embrapa 2011a.

_____. **Batata-doce BRS Cuia**. Pelotas: Embrapa 2011b.

_____. **Batata-doce BRS Rubissol**. Pelotas: EMBRAPA 2011c.

DE CASTRO, L. A. S.; CHIELLE, Z. G.; BECKER, A. **BRS Fepagro Viola**: Batata-doce de dupla finalidade. Pelotas: Embrapa 2016.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/> >. Acesso em: 04 março 2016.

PETTERLE, E. C. **Produção Descentralizada de Etanol Visando suprir a Planta de Eteno Verde da Braskem**. Porto Alegre: Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2015.

SCHWEINBERGER, C. M. **Inovação e Otimização no Processo de Produção de Etanol a Partir de Batata-doce**. Porto Alegre: Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2016.

SUN, H. et al. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves as nutritional and functional foods. **Food Chemistry**, v. 156, p. 380-389, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84896859535&partnerID=40&md5=b23da751688a9a000716426a1db31d7f> >.

UNICA. UNICADATA. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/> >. Acesso em: 03 março 2016.

Capítulo 10 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Neste capítulo é feito um balanço dos objetivos iniciais do trabalho discutindo em que extensão foram atingidos. A seguir, discutem-se as principais conclusões desta tese. Apesar dos avanços alcançados com essa tese, ainda existem pontos a serem aprimorados. Sendo esses discutidos na última seção, destinada a sugestões de trabalhos futuros.

10.1 Balanço dos objetivos propostos

Os objetivos pontuados no início do trabalho (seção 1.2) seguem reescritos e comentados:

O1 - Estudo de diferentes métodos de hidrólise do amido e quantificação de glicose, visando identificar as alternativas mais práticas, econômicas e que levam aos resultados mais acurados:

- Entre os métodos alternativos, a hidrólise ácida se demonstrou mais promissora, mas se recomenda que mais experimentos sejam feitos, pois os métodos testados ainda devem ser aperfeiçoados. O estudo desenvolvido foi importante ao apontar direções para próximos experimentos, como é discutido na seção 10.2 sobre conclusões gerais.

O2 - Desenvolver um processo prático com simplificação de etapas. No que tange a este objetivo, foram feitas as seguintes contribuições:

- Proposta de aquecimento prévio da batata (única etapa térmica, o que também possibilita maior economia energética);
- Passo seguinte de trituração facilitado pelo amolecimento da batata;

- Com o aquecimento prévio o amido ficou significativamente mais susceptível às enzimas amilolíticas;
- Possibilidade de maior simultaneidade. Processos simultâneos: hidrólise completa, fermentação e redução da viscosidade;
- Com o novo método de processamento o tempo de fermentação pôde ser reduzido de 24 h para 19 h.

O3 - Atingir rendimento e eficiência satisfatórios: teor de etanol no vinho entre 10 – 12% (v/v), que é o intervalo geralmente observado nas usinas no mundo, e eficiência de conversão em etanol no em torno de 90%. Aqui os resultados atingidos podem ser sumarizados da seguinte forma:

- Nos estudos para a definição básica do processo tais patamares já foram atingidos. Porém, no processo então adotado, esse objetivo foi alcançado a partir do Capítulo 6. Neste Capítulo foi estudado o efeito das variáveis pH, tempo e temperatura de HSF sobre a eficiência de conversão. Como resultado, para o aumento da eficiência o tempo foi reduzido de 24 h para 19 h e a temperatura aumentada de 32°C para 34°C Outra contribuição importante ocorreu no Capítulo 7, onde se constatou que o amadurecimento da batata é substancialmente positivo para a hidrólise do amido.

O4 - Avaliar os custos do processo e identificar os fatores mais significativos. Com relação a este objetivo, pode-se destacar:

- Análise realizada no Capítulo 7. Viu-se que a levedura e a matéria-prima são os fatores de maior impacto no custo. A questão da levedura pode ser contornada com seu reciclo através da imobilização, flotação, etc. Outra possibilidade seria o cultivo da levedura através de pré-inóculo. Para o caso da matéria-prima, seu custo pode ser reduzido com: (i) a utilização de batatas com menor umidade e (ii) com fermentações de eficiências elevadas, pois assim se extrai mais produto da matéria-prima. Mas, entre os dois itens, o de maior impacto no custo é a umidade da batata.

O5 - Identificar possíveis dificuldades na escala industrial, caracterização e proposta de soluções:

- A maior dificuldade identificada foi a elevada quantidade de sólidos após a fermentação, onde 43% da massa ficou retida na torta de filtração a vácuo (papel qualitativo com poros de 4 - 12µm). Tais sólidos podem influenciar negativamente dois processos: (i) separação da levedura para o reciclo e (ii) recuperação do etanol. Sobre o último tópico, a injeção de CO₂ durante a destilação pode potencializar a extração do etanol retido nos sólidos, mas é uma possibilidade que deve ser verificada através de estudos adicionais. As demais propostas de soluções são apresentadas na subseção 10.3, destinada à sugestões para trabalhos futuros.

O6 - Análise teórico-experimental do comportamento do sistema na separação do etanol da mistura etanol-água-CO₂ e de um vinho de batata-doce:

- Sendo a destilação com CO₂ um processo inovador, neste estudo foi dado o primeiro passo experimental para tal possibilidade, de maneira que o estudo desenvolvido trouxe mais pontos a investigar do que respostas. Contudo, as pendências observadas são contribuições importantes para futuros estudos.

10.2 Conclusões gerais

Nos estudos de fermentação, foi possível a obtenção de teores de etanol ~12% (v/v), mas com uma significativa quantidade de batata-doce no meio, 1,5: 1 (kg: L). Nestas condições há o problema da viscosidade final do mosto fermentado, mas este problema pode ser reduzido com o emprego de uma enzima desintegrante dos componentes da parede celular. Neste trabalho do uso da Pectinex Ultra AFP resultou em uma diferença visível (Figura 5.3).

Quando foi selecionado o processo de simultaneidade de fermentação, hidrólise completa e redução de viscosidade, foi realizado um estudo comparativo entre a batata-doce previamente aquecida e não. Viu-se que embora o desenvolvimento da mistura enzimática Stargen 002 tenha sido direcionado para a hidrólise do amido granular, verificou-se que o desempenho é mais pronunciado quando o amido está previamente gelatinizado. Com a batata-doce previamente aquecida foi obtido um teor de etanol de 9,25% (v/v) em 24 h, enquanto que com a batata-doce crua o teor foi de 6,13% (v/v) em 58 h, ou seja, com o aquecimento prévio o resultado foi 51% superior. Caso os resultados fossem equivalentes, seria bastante positivo na economia energética pelo não aquecimento. No entanto, a proposta de aquecimento prévio também é uma contribuição relevante, pois há a economia energética pela redução da massa aquecida, e pela redução da temperatura para 76°C. Tal proposta é simples, mas não se encontrou na literatura processo semelhante.

Nos experimentos do planejamento composto central, o pH não influenciou significativamente, mas a temperatura e o tempo sim, e os resultados foram mais sensíveis à temperatura do que ao tempo (Figura 6.6). Contudo, já se vinha trabalhando na região ótima da temperatura, então a maior contribuição foi na redução do tempo para 19 h. Um tempo de fermentação menor permite em uma usina maior rotatividade entre as dornas, com isto um menor número de dornas é necessário, reduzindo o custo de investimento.

Sabendo que a batata-doce sintetiza amilases e que elas atuam gradualmente após a colheita, avaliou-se se o tempo pós-colheita exerceria efeito positivo sobre a produção de etanol, o que de fato foi comprovado. Nos experimentos realizados, a maior produção de etanol foi encontrada no tempo de 25 dias após a colheita. Fazendo-se a média entre os resultados dos dois métodos de aquecimento testados, convencional e com micro-ondas, o menor e maior valor da eficiência de conversão foram 74% (4 dias) e 113% (25 dias), um significativo aumento de 53%.

O aquecimento por micro-ondas não aumentou a eficiência de conversão, como inicialmente suposto. O aquecimento convencional demonstrou desempenho um pouco superior em termos de eficiência de conversão (9% maior, em 25 dias). A análise de custos apresentada no Capítulo 7 também não foi muito favorável ao emprego do micro-

ondas. Apesar destes resultados, não se aconselha que esta tecnologia seja descartada de futuros estudos, mas sim aperfeiçoada, pois o micro-ondas possui as vantagens do aquecimento rápido e é compacto.

A equação proposta para estimar o teor de açúcares redutores totais (ART) foi construída com dados de umidade no intervalo de 67,4 – 77,5%. No Capítulo 7, onde se acompanhou a produção de etanol durante o amadurecimento da batata-doce, a maior umidade constatada ao longo do experimento foi de 77,03%, ou seja, muito próxima do limite superior do intervalo mencionado. Com o amadurecimento da batata foram obtidas eficiências de conversão superiores a 100%, então se supôs que o tempo pós-colheita teria sido muito influente neste resultado, aconselhando que a equação fosse reconstruída com resultados de análises feitas em batatas amadurecidas.

No Capítulo 4, onde se estudou métodos de hidrólise para a quantificação de glicose, a batata-doce foi amadurecida por 25 dias no segundo e terceiro estágios. A amostra do segundo estágio tinha umidade de 71,71%, levando ao teor teórico de ART de 25,03%, e o teor de glicose experimental quantificado com o método da Megazyme foi 23,79%. A amostra do terceiro estágio tinha umidade de 67,39% (no limite inferior do intervalo de umidade da curva teórica), resultando no teor teórico de ART de 29,87%, e o teor de glicose experimental foi 29,28% (método da Megazyme). Ou seja, nos experimentos do Capítulo 4 os resultados experimentais e teóricos ficaram próximos, mas os valores experimentais não ultrapassaram os teóricos, a exemplo do que ocorreu no Capítulo 7.

Dadas estas informações sobre os resultados da aplicação da equação proposta, alguns pontos devem ser discutidos. É importante ressaltar que a equação foi construída com dados de diferentes batatas-doces, poderia se esperar respostas mais acuradas de uma equação construída com dados de um tipo de batata e de fontes controladas. Recomenda-se que esta nova equação seja construída, mas isto envolve mais etapas de estudo (iniciados no Capítulo 4). Desta forma, reconhece-se a limitação da equação apresentada nesta tese, mas enquanto não se dispõe de um aprimoramento, a equação possui aplicabilidade ao fornecer uma boa estimativa inicial da magnitude a se esperar de um resultado experimental. Quanto ao aprimoramento da equação, continua-se a destacar a importância do amadurecimento da batata. Tanto que, no Capítulo 4, apesar dos resultados experimentais não terem superado o teor teórico de ART, como se supôs inicialmente, os resultados experimentais e teóricos ficaram próximos, e se atribuí ao amadurecimento ter influenciado nisso.

Sobre o conteúdo abordado no Capítulo 4: estudos comparativos entre métodos analíticos para a quantificação de glicose total na batata-doce, foram estudos importantes para uma futura construção da curva umidade x ART, dado que a confiabilidade da curva também é dependente do método experimental utilizado na obtenção dos pontos. Viu-se que melhores resultados são obtidos com a batata-doce fresca ao invés de seca, também que a casca não interfere nos resultados. Ter este conhecimento torna o experimento mais prático, pois não é necessária a secagem e nem a remoção da casca.

O método da Megazyme resultou nos maiores teores de glicose, mas possui a desvantagem de ser o mais caro, sendo desejável um método mais barato quando na realização de uma série de análises, como para a construção de curva umidade x ART. Em

termos de reagentes, os custos por análise foi estimado em: Megazyme US\$ 7,16; hidrólise ácida US\$ 0,0081 e; com a Stargen 002 US\$ 0,0022.

Entre a hidrólise ácida e com a Stargen 002, a hidrólise ácida se demonstrou mais promissora. No terceiro estágio do Capítulo 4 o teor de glicose da hidrólise ácida (26,76%) foi um pouco inferior ao da Megazyme (29,28%), mas pelo teste de Tukey não houve diferença significativa. No que diz respeito à hidrólise com a Stargen 002, não é aconselhável o descarte desta possibilidade, mas sim que mais testes sejam realizados objetivando melhorias, fatores importantes para mais estudos são a agitação mais intensa e a redução de dose. Caso o método com a Stargen 002 fosse melhorado teria a vantagem de ser mais seguro e prático do que a hidrólise ácida.

É importante que a investigação iniciada no Capítulo 4 continue a ser realizada, melhorando os métodos a fim de maximizar a quantificação da glicose. De preferência, focando também na praticidade e baixo custo da análise.

Sobre o estudo de injeção de CO₂, viu-se que são necessários aperfeiçoamentos no modelo. Contudo, os resultados experimentais mostraram que se conseguem maiores concentrações de etanol no condensado nas menores vazões de CO₂, e as concentrações foram maiores do que nas condições de equilíbrio previstas pelo modelo. Os resultados foram os primeiros do estudo experimental desenvolvido no GIMSCOP, norteando direções tanto para o aperfeiçoamento do aparato experimental, quanto para outros pontos experimentais a estudar.

10.3 Sugestões para trabalhos futuros

10.3.1 *Aperfeiçoamento do modelo para a estimativa dos ART*

O aperfeiçoamento do modelo para a estimativa dos ART consiste em concluir o trabalho que foi iniciado nesta tese, considerando as questões já discutidas, sobre a seleção do método analítico para a quantificação de glicose e sobre a construção de uma curva específica para um tipo de batata-doce de fontes controladas.

10.3.2 *Estudo da destilação com injeção de CO₂*

Nesta tese foi dado o primeiro passo experimental sobre este tema, restando muitos pontos a serem explorados, como foi discutido em detalhes na conclusão do Capítulo 8. Aperfeiçoamentos no aparato experimental devem ser realizados, e são sugeridos outros pontos experimentais a estudar, como experimentos em menores vazões de CO₂ e também sobre o processo de condensação (temperatura do fluido refrigerante e área do trocador de calor).

Adicionalmente, a introdução de CO₂ traz diversas vantagens, já citadas, mas também algumas desvantagens, tais como: a necessidade de menor temperatura de refrigeração; aumento da vazão interna de gás resultando em aumento do diâmetro da coluna e; a instalação de um sistema de reciclo do CO₂. Estes fatores sugerem que deve ser feito um

estudo relativo ao projeto otimizado deste processo, de forma a avaliar de maneira sistemática o impacto no custo de investimento e operacional da unidade.

10.3.3 Aprofundamento do estudo sobre o método de aquecimento

Nos experimentos desta tese se constatou que na temperatura de 76°C já se atingia um resultado interessante, então esta temperatura foi fixada. Sugere-se que seja feito um estudo considerando a possível redução de tal temperatura, avaliando em intervalos mais estreitos, como 76°C, 74°C, 72°C, etc. Também, como já abordado na conclusão, sugere-se que mais estudos sejam realizados considerando o possível emprego de micro-ondas no processo.

10.3.4 Estudos para a redução do custo com a levedura

Como foi visto, a levedura exerce destacado impacto sobre custo final, portanto, todo estudo que visa a redução de seu custo é de importante contribuição, as alternativas sugeridas foram o reciclo e o cultivo da levedura através de pré-inóculo.

10.3.5 Redução do teor de sólidos

O estudo pode ser realizado sobre a questão enzimática e de trituração. No que se refere ao processo enzimático, recomenda-se fortemente o teste com outras enzimas. Devido à heterogeneidade das cadeias das substâncias pécicas e da hemicelulose, acredita-se que o emprego de uma mistura mais variada de enzimas garantiria uma hidrólise mais completa. Fragmentos de uma hidrólise incompleta de tais macromoléculas ainda poderiam formar complexos com o líquido do meio, dando origem aos sólidos residuais. Variáveis como concentração enzimática, temperatura e pH também podem ser estudadas, mas a margem de variação para a temperatura e o pH é estreita, devido à simultaneidade com a hidrólise do amido e a fermentação. Sobre o processo de trituração, modificações mecânicas podem ser propostas, no sentido de otimizar as forças de impacto e corte.

10.3.6 Aumento da concentração de substrato no meio

Pode-se almejar a obtenção de teores de etanol nos patamares de 15 – 16% (v/v), que somente poderá ser obtido com o aumento da concentração de substrato. Sugere-se a utilização de batatas mais secas. Com isto, a concentração de batata no meio pode ser aumentada gradativamente, avaliando o efeito sobre a eficiência de conversão e viscosidade. Assim, o limite máximo para o aumento da concentração pode ser identificado.

10.3.7 Estudos sobre a produção de coprodutos

Conforme abordado no Capítulo 9, a receita de uma biorrefinaria de batata-doce pode ser aumentada através de coprodutos, produzidos a partir da parte aérea da planta e da

torta da fermentação. São possibilidades para a produção de alimentos de valor agregado, mas para isto é necessário um estudo de caracterização nutricional, testes de aplicabilidades em alimentos e avaliação sensorial.

10.3.8 Estudos para a redução ou remoção do antibiótico

Nas fermentações realizadas nesta tese foi feito o uso de antibiótico para a prevenção de contaminações. Contudo, seria interessante a realização de um estudo para reduzir a dose ou mesmo eliminar a necessidade de tal insumo, até porque possui um considerável custo (7,94% do custo total no processo convencional e reciclo de 11 vezes).