

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO-PR

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DE BATATA-DOCE
EM FUNÇÃO DO MEIO FERMENTATIVO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

AMANDA CANTOS LOPES

GUARAPUAVA-PR

2013

AMANDA CANTOS LOPES

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DE BATATA-DOCE
EM FUNÇÃO DO MEIO FERMENTATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende

GUARAPUAVA-PR

2013

Dedicatória

Ao mestre dos mestres, meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende, pela orientação e principalmente pela amizade, confiança e paciência por todo período de desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues pela amizade e apoio, por estar sempre disponível para ajudar.

A professora Dra. Ísis Kaminski Caetano, pela boa vontade em me auxiliar e por vezes ensinar as análises estatísticas e a Mestranda em Bioenergia Larissa Matos pelo programa Desig Expert ®, versão 8.

As professoras Dra. Cacilda Márcia Duarte Rios Faria e professora Dra. Carla Daiane Leite, pelo empréstimo de equipamentos, como a autoclave, de muita importância no projeto.

Aos professores Dr. Osmar Roberto Dalla Santa e professora Dra. Herta Stutz Dalla Santa, do Departamento de Engenharia de Alimentos pelo empréstimo das mantas de destilação utilizadas no desenvolvimento da pesquisa.

As meninas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Juliana Tauffer, Édyna Newman, Juliane Henschel, Isabela Lima, em especial a Anni Silvestri Gomes, pelo apoio incondicional em todos os momentos de alegrias e loucuras, desapontamentos e trabalho.

À Prof. Dra. Adriana Knobb pelo auxílio na diluição de enzimas.

Aos amigos Aline Viomar e Paulo Vitor Sochodolak, José Batista de Camargo Jr, guebs, Ellen Bernardi, com quem sempre pude contar. Ao grupo de pesquisa em eletroquímica, GPEL, Laboratório de Combustíveis e de Águas, pelo auxílio.

À minha família e ao meu esposo pelo indiscutível e constante incentivo.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o desenvolvimento desta pesquisa.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Símbolos e Abreviações	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1.Introdução	01
2.Objetivos	03
3. Referencial Teórico	04
3.1 Matriz Energética.....	04
3.2 Biomassa.....	06
3.2.1 Batata-doce.....	08
3.3 Hidrólise.....	11
3.3.1 Hidrólise Ácida	12
3.3.2 Hidrólise Enzimática	12
3.4 Fermentação.....	14
3.5 Álcool.....	15
4 Metodologia	18
4.1 Local do Experimento.....	18
4.2 Batata-doce.....	18
4.2.1 Teor de Umidade.....	18
4.2.2 Teor de Açúcares Redutores.....	19
4.2.3 Teor de Amido.....	21
4.3 Processo de Obtenção do Álcool.....	22
4.3.1 Hidrólise.....	23
4.3.2 Fermentação.....	25

4.3.3	Destilação.....	26
4.4	Triagem de Resultados.....	26
4.5	Determinação do Teor de Álcool.....	27
4.6	Planejamento Fatorial 2^2	28
4.7	Planejamento Fatorial 2^3	29
5	Resultados e Discussões.....	32
5.1	Batata-doce.....	32
5.1.1	Teor de Umidade.....	32
5.1.2	Teor de Açúcares Redutores.....	33
5.1.3	Teor de Amido.....	34
5.2	Triagem de Resultados.....	35
5.3	Determinação do Teor de Álcool.....	37
5.4	Delineamento Estatístico.....	38
5.4.1	Análise do Planejamento Fatorial 2^2	38
5.4.2	Análise do Planejamento Fatorial 2^3	48
6	Conclusões.....	63
7	Sugestões para trabalhos futuros.....	64
8	Referências Bibliográficas.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da matriz energética do Brasil em relação ao mundo e ao OCDE (EPE, 2012).....	04
Figura 2. . Diagrama esquemático dos processos de conversão energética da biomassa (ANEEL, 2002).....	07
Figura 3. Representação molecular dos polissacarídeos contidos no amido (BOBBIO, 2003).....	11
Figura 4. Representação esquemática do ciclo fechado de produção de etanol, adaptado (National Ethanol Vehicle Coallition).....	16
Figura 5. Fluxograma da titulação usada para calcular o Fator dos reagentes Fehling A e B.....	20
Figura 6. Fluxograma da titulação de açúcares redutores.....	21
Figura 7: Etapas compreendidas no processo fermentativo.....	22
Figura 8. Fluxograma da hidrólise.....	24
Figura 9. Teor de açúcares redutores presentes nos genótipos de batata-doce.....	34
Figura 10. Teor de amido presente nos genótipos de batata-doce.....	35
Figura 11. Obtenção de etanol via destilação do mosto após fermentação em diferentes tempos.....	36
Figura 12. Curva de calibração para a determinação do teor alcóolico obtida por meio do espectrômetro de UV-Vis.....	37
Figura 13. Gráfico normal para os efeitos principais, para o planejamento 2^2	41
Figura 14. Gráfico normal considerando a média dos ensaios, para o planejamento 2^2	41
Figura 15. Interação entre os efeitos 12 , tempo/meio, do planejamento 2^2	42
Figura 16. Resíduos gerados pela falta de ajuste para o planejamento fatorial 2^2	46
Figura 17. Resíduos gerados pelo erro puro para o planejamento fatorial 2^2	47
Figura 18. Combinação entre fatores e os níveis de variação em função dos resultados do planejamento experimental 2^2	48
Figura 19. Gráfico normal para os efeitos principais, para o planejamento 2^3	51
Figura 20. Gráfico normal considerando média dos ensaios para o planejamento 2^3	52

Figura 21. Interação entre os efeitos 12 , tempo/genótipo, do planejamento 2^3	53
Figura 22. Interação entre os efeitos 13 , tempo/levedura, do planejamento 2^3	54
Figura 23. Resíduos gerados pela falta de ajuste para o planejamento fatorial 2^3	60
Figura 24. Resíduos gerados pelo erro puro para o planejamento fatorial 2^3	60
Figura 25. Análise do melhor ensaio pelo método do cubo.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de energia do Brasil, anos 2010 e 2011 (EPE, 2012).....	05
Tabela 2. Composição média em 100 gramas de matéria fresca de batata-doce (EMBRAPA, 2004).....	09
Tabela 3. Ensaios do planejamento fatorial 2^2	29
Tabela 4. Combinação dos ensaios do planejamento 2^2	29
Tabela 5. Ensaios do planejamento fatorial 2^3	30
Tabela 6. Combinação dos ensaios do planejamento 2^3	31
Tabela 7. Dados de teor de massa fresca, seca e água dos genótipos de batata-doce.....	32
Tabela 8. Ensaios realizados do planejamento 2^2 com dados experimentais, média dos resultados, grau de liberdade e variância.....	38
Tabela 9. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^2 e os erros padrões.....	40
Tabela 10. Tabela ANOVA para o planejamento fatorial 2^2	45
Tabela 11. Ensaios realizados do planejamento 2^3 com dados experimentais, média dos resultados, grau de liberdade e variância.....	49
Tabela 12. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 e os erros padrões.....	50
Tabela 13. Tabela ANOVA para o planejamento fatorial 2^3	58

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
MME	Ministério de Minas e Energia
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
BEN	Balanco Energético Nacional
Mtep	Megatonelada equivalente de petróleo
IAL	Instituto Adolfo Lutz
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
ATP	Adenosina tri-fosfato, nucleotídeo responsável por armazenar energia
AR	Açúcares Redutores
UGA	Unicentro Guarapuava Agronomia
°GL	Teor alcóolico Gay Lussac, porcentagem de álcool em 100 mL de água
UV	Ultra-Violeta
λ	Comprimento de onda, em nanômetros, nm.
S_i^2	Variância
S	Desvio padrão

RESUMO

LOPES, A. C. **Obtenção e caracterização de etanol produzido a partir de genótipos de batata-doce e avaliação do meio fermentativo.** 2013 78 p. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO. Guarapuava, PR.

A busca por combustíveis mais limpos e renováveis têm incentivado pesquisas, a exemplo do etanol produzido a partir da biomassa. Um dos combustíveis mais promissores do Brasil é o etanol, entretanto sua produção encontra-se centralizada na cultura de cana-de-açúcar, desta forma o estudo de outras fontes de biomassa que possam produzir álcool e substituir a monocultura da cana tem sido alvo de pesquisas. Este projeto tem como objetivo principal estudar as variáveis do processo fermentativo visando à produção de etanol, tais como: tempo de fermentação, adição de nutrientes e tipo de fermento usado na produção de o etanol a partir de dois genótipos de batata-doce, UGA 05 e UGA 77. As técnicas empregadas neste estudo foram: determinação do teor de açúcares redutores e de amido contido em diferentes genótipos de batata-doce, hidrólise do material amiláceo, fermentação, destilação, espectroscopia do UV-Vis e discussão de dados estatísticos realizados de acordo com dois fatoriais, 2^2 e 2^3 de planejamento experimental, os resultados foram tratados utilizando o softwar Design Expert®, versão 8 sendo a resposta em teor de álcool, °GL. Os resultados do planejamento experimental 2^2 indicam que o tempo de fermentação na produção de etanol apresentou efeito significativo no processo, sugerindo que a produção de etanol é mais eficiente no tempo de 72 horas de fermentação. No planejamento fatorial 2^3 as interações formadas entre o tempo de fermentação com os genótipos e com o fermento caracterizam-se como efeitos significativos e alteraram a produção de álcool. Os resultados indicam que há diferença significativa no processo em função do material genético e da levedura utilizada. A fermentação do genótipo UGA 77 sob a ação da levedura em tablete na condição de 72 horas de fermentação apresentaram-se como as melhores condições que resultam em maior produção de etanol.

Palavras-chave: biocombustível, hidrólise, *Saccharomyces cerevisiae*, nutrientes, fermentação.

ABSTRACT

AMANDA, A. C. **Obtenção e caracterização de etanol produzido a partir de genótipos de batata-doce e avaliação do meio.** 2013, 78 p. Dissertation (Master's Degree in Bioenergy) Midwest State University, Guarapuava, PR.

The search for cleaner and renewables fuels encouraged research, such as ethanol produced from biomass. One of the most promising fuels in Brazil is ethanol, but its production is centered in the culture of sugar cane, so the study of other sources of biomass that can produce alcohol and replace the monoculture of sugarcane has been the target of research. This project aims to study the main variables of the fermentation process aiming the production of ethanol, such as fermentation time, adding nutrients and type of yeast used in the production of ethanol from two genotypes of sweet potato, UGA 05 UGA and 77. The techniques used in this study were: determination of reducing sugars and starch contained in different genotypes of sweet potato, hydrolysis of starch material, fermentation, distillation, UV-Vis spectroscopy and discussion of statistical performed according to two factorial , 2^2 and 2^3 of experimental design. The results were treated using the softwar Design Expert ® version 8 being the answer in alcohol content, GL °. The results of the experimental 2^2 indicate that the fermentation time ethanol production process showed significant effect, suggesting that ethanol is more efficient in time of 72 hours of fermentation. However the 2^3 factorial design time had no significant effect, but the interactions formed between him and the type of genotype and yeast used in the fermentation process, were significant and altered the production of alcohol. The results indicate that no significant difference in process due to genetic material used in the process as well as the use of yeast when used in the tablet UGA 77fermentation the genotype. It was possible to obtain better results in ethanol production.

Key-words: biofuel, hydrolysis, *Saccharomyces cerevisiae*, nutrients, fermentation.

1. INTRODUÇÃO

No decorrer de toda a história do desenvolvimento das civilizações, sempre houve a utilização de alguma forma de energia, pois é essencial para a sobrevivência humana. Atualmente a energia utilizada é concentrada no uso de fontes não renováveis de energia, como o petróleo que ocupa o papel principal neste cenário. Possui larga utilização como combustível e desta forma movimentou vários segmentos industriais, em especial, da indústria automobilística. Porém, os impactos negativos da utilização dos combustíveis fósseis, como a grande emissão de gases poluentes durante a combustão aliado a escassez de reservas de petróleo torna relevante a necessidade de desenvolvimento e geração de tecnologias que contribuam tanto para sanar a demanda e o consumo de energia bem como agregar valor no emprego de fontes de energia limpa e renovável e de forma sustentável (SILVEIRA, 2008).

O grande desafio que a humanidade enfrenta é conciliar, de maneira sustentável, dois elementos imprescindíveis para sobrevivência, sendo a soberania energética e segurança alimentar. Isso se deve ao fato de que, os principais biocombustíveis com a capacidade de substituir os combustíveis derivados de petróleo, são obtidos da biomassa, a exemplo do biodiesel e o etanol. Desta maneira, o estudo e o aprimoramento das matérias-primas são essenciais para a solidificação destes biocombustíveis na matriz energética mundial (SILVEIRA, 2008).

Existem diversos tipos de matérias-primas agrícolas de onde é possível produzir álcool, sendo estas principalmente armazenadoras de açúcares e amido. A obtenção de álcool a partir de culturas amiláceas ainda é pouco difundida no Brasil, entretanto em outros países esta técnica está sendo adotada, os Estados Unidos que produzem etanol combustível a partir da hidrólise seguida da fermentação do milho. Apesar da utilização do milho como matéria-prima para a produção de combustível, o mesmo apresenta problemas de adaptação a determinados climas, baixos valores de balanço energético, além de competir diretamente com a cadeia alimentar (PIMENTEL e PATZEK, 2005).

A cana-de-açúcar é um exemplo, bem sucedido, de espécie que armazena açúcar, utilizado para a produção de álcool. O Brasil possui uma longa tradição no uso desta fonte renovável de energia, e em detrimento disto a cana domina a produção de etanol no país, como consequência, a matriz energética é centralizada apenas em uma cultura (MAPA, 2008).

Outras matérias-primas com potencial para produção de etanol estão sendo estudadas, destacando-se a beterraba, mandioca e a batata-doce. Dentre essas três culturas, a batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.)] possui características favoráveis que permitem classificá-la como

uma espécie promissora para a produção de combustível, principalmente por ser uma cultura que se adapta facilmente a solos de baixa e média fertilidade, por ser mais resistente às pragas e doenças, apresenta ciclo de produção curto, entre 4 a 6 meses e também é pouco poluente uma vez que não há necessidade da queima das ramas para colheita (CARDOSO, 2005).

A obtenção do álcool a partir de batata-doce depende de dois processos importantes, primeiramente a hidrólise que consiste na transformação do amido em açúcares, também chamada de sacarificação, o processo posterior é a fermentação dos açúcares e o produto reacional é o álcool. A hidrólise ou sacarificação do amido é de suma importância como um todo no processo visando à produção de álcool, pois é a partir deste processo em que são liberados açúcares com potencial para serem fermentados. A hidrólise pode ser feita via ácida ou enzimática. A hidrólise ácida é mais rápida e tem menor custo, porém exige controle do pH da solução açucarada e como desvantagem há destruição do polissacarídeo e geração de açúcares não fermentáveis. A hidrólise enzimática possui maior eficiência, visto que as enzimas possuem grande especificidade em quebrar as ligações do amido gerando açúcares fermentáveis. Este processo ocorre em reatores e as enzimas são de origem vegetal ou microbiana, destacando-se as enzimas α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase (FELTRAN, 2009).

A fermentação ocorre pela adição de leveduras que são micro-organismos responsáveis pela transformação dos açúcares em álcool. Apresentam algumas características essenciais, como: alta produtividade fermentativa, elevados níveis de conversão do substrato em produto em curto espaço de tempo, boa tolerância ao produto formado e resistência a elevadas concentrações de substrato. Um tipo de levedura frequentemente utilizada para diversos processos industriais por apresentar essas características é a *Saccharomyces cerevisiae* (CARDOSO, 2005).

Desta maneira, o intuito principal deste trabalho é avaliar o potencial de produção de álcool a partir de diferentes clones de batata-doce, bem como avaliar o efeito do tempo de fermentação, e de variedade de levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* e do meio fermentativo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir álcool a partir da fermentação de dois genótipos de batata-doce.

2.2 Objetivos Específicos

Obter e determinar o teor alcóolico do álcool produzido a partir de dois genótipos de batata-doce UGA 05 e UGA 77, obtido por meio de processos de hidrólise enzimática, fermentação e destilação;

Avaliar a influência do tempo de fermentação, meio fermentativo, entre genótipos e tipo de leveduras empregadas no processo fermentativo da batata-doce.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Matriz Energética

Entende-se por matriz energética toda forma de energia que pode ser transformada e consumida. É de forma geral dividida entre fontes renováveis e não renováveis de energia (EPE, 2012).

A comparação da matriz energética brasileira em relação ao consumo mundial e aos países que compõem a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico na Europa) foi dividida entre fontes renováveis e não renováveis de energia e apresentada na Figura 1. Estes resultados foram fornecidos por meio do Balanço Energético Nacional (BEN), sendo um relatório bastante detalhado das análises propostas pelo Ministério de Minas e Energia (MME), instituição responsável por formular os princípios básicos e definir diretrizes da política energética nacional, juntamente com a Empresa de Pesquisa Energética (EPE), empresa pública que presta serviços na área de estudos e pesquisas do setor energético. Anualmente são entregues relatórios referentes à contabilização da oferta, transformação e consumo final de produtos energéticos do Brasil (EPE, 2012).

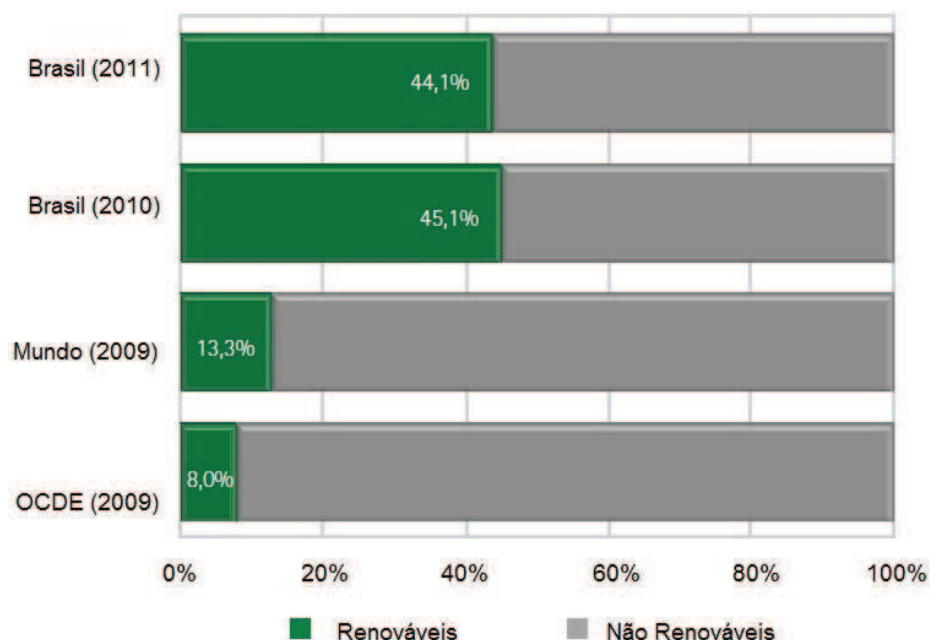


Figura 1. Representação da matriz energética do Brasil em relação ao mundo e ao OCDE (EPE, 2012).

Com base nas informações contidas na matriz energética, fica evidente a realidade em que vivemos, a grande dependência de fontes não renováveis de energia. Mundialmente o consumo de fontes não renováveis atinge níveis acima de 85% e apenas 13,3% do total de energia consumida são provenientes de fontes renováveis. Na Europa o consumo de fontes não renováveis é ainda maior, com valores de 92%, o que justifica a importância do desenvolvimento e geração de tecnologia que aumente o emprego do uso de fontes renováveis de energia (EPE, 2012).

O Brasil é considerado exemplo mundial em termos de fornecimento de energia, visto que a sua matriz energética é bastante diferente da encontrada em relação ao mundo e ao OCDE, onde se observa um aumento significativo na participação de renováveis, apresentando valores de 44,1% e 45,1%, dos anos 2010 e 2011, respectivamente (EPE, 2012).

De modo geral quase metade da energia consumida no Brasil provém de fontes renováveis, a variação observada é devido a oferta de etanol, em função da produtividade de cana-de-açúcar. Sendo assim, no cenário nacional a produção de álcool biocombustível ocupa papel importante no mercado (EPE, 2012).

A matriz energética brasileira detalhada, foi dividida nas grandes classes renovável e não renovável e composta dos diferentes tipos de matéria-prima energética aplicada para produção de energia (EPE, 2012).

Tabela 1. Distribuição de energia do Brasil, anos 2010 e 2011 (EPE, 2012).

	em Mtep	
Fonte	2011	2010
RENOVÁVEIS	120,1	121,2
Energia hidráulica e eletricidade	39,9	37,7
Biomassa da cana	42,8	47,1
Biomassa tradicional	26,3	26,0
Outras renováveis	11,1	10,4
NÃO RENOVÁVEIS	152,2	147,6
Petróleo	105,2	101,7
Gás Natural	27,6	27,5
Carvão mineral	15,2	14,5
Urânio	4,1	3,9

Dentre as fontes não renováveis utilizadas, encontram-se uso o petróleo, gás natural, carvão mineral e urânio. Por outro lado, as fontes de energia renováveis utilizadas são a hidrelétricas, biomassa de cana e tradicional e outras como solar, geotérmica, eólica.

Analisando esta tabela, observa-se que a matriz energética renovável está concentrada na hidráulica e biomassa da cana, pois o somatório das parcelas de ambas as energias ultrapassa 80% do total de energias renováveis utilizadas, restando uma pequena parcela para as demais biomassas e outras fontes. Assegurando desta forma a importância do desenvolvimento de tecnologia no emprego de outras fontes de biomassa capazes de produzir etanol (EPE, 2012).

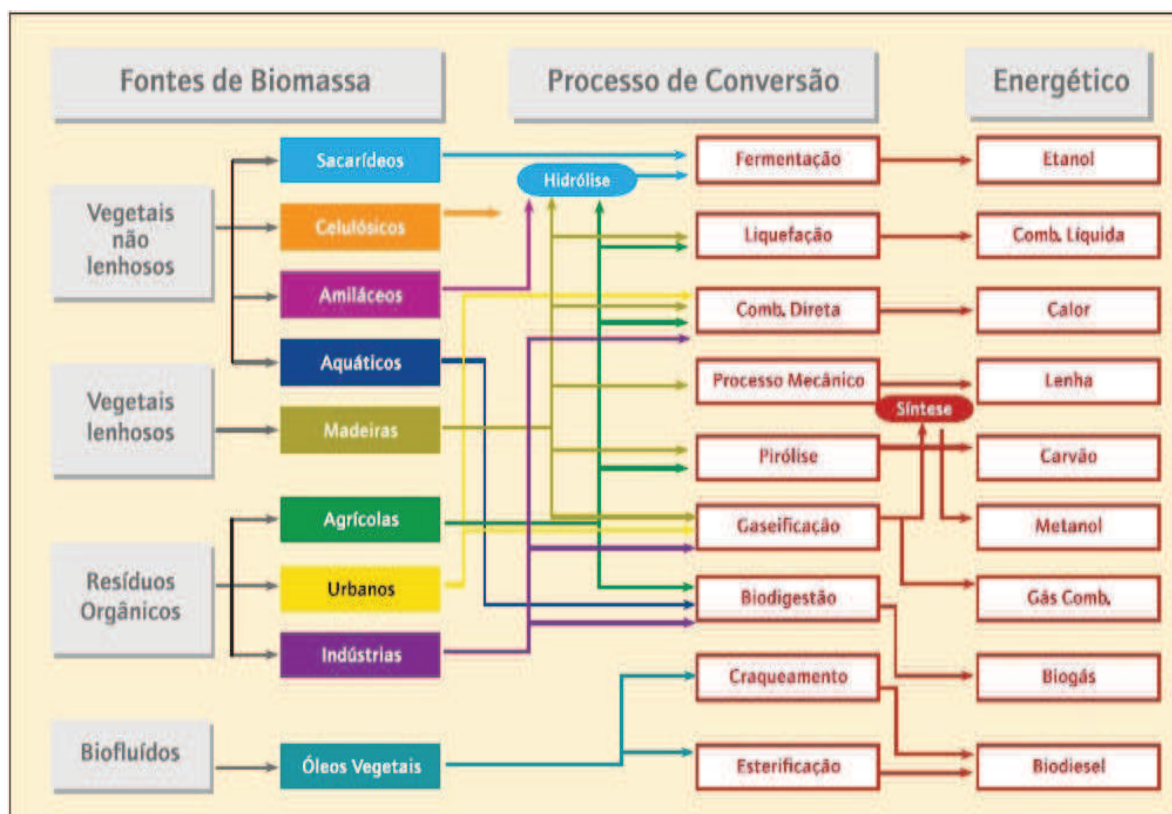
A biomassa é conhecida como fontes orgânicas com potencial para geração de energia, que pode ser de origem vegetal ou animal. É amplamente utilizada em caldeiras para geração de calor e energia, sendo que parte desta biomassa é destinada à produção de biocombustíveis, como o biodiesel e o etanol. Pelo fato do Brasil apresentar uma vasta área territorial, torna ele um país privilegiado para produção de biomassa vegetal e isto resultou em crescentes estudos no desenvolvimento de energias limpas e renováveis (NREL, 2011) (CINELLI, 2012).

3.2 Biomassa

Atualmente a alternativa energética para fazer frente ao petróleo é tocada na agricultura com o cultivo de vegetais, ou seja, biomassa com potencial para a produção de biocombustíveis, como etanol e biodiesel. A energia produzida pelos vegetais pode ser transformada, por meio de reações químicas, por exemplo, a hidrólise e fermentação, cuja finalidade reside na obtenção de produtos com potencial para geração de energia, como o álcool (SILVEIRA, 2008).

A biomassa vegetal é considerada como sendo fonte de energia, pois é a energia gerada como resultado da fotossíntese que pode ser transformada em produtos energéticos. As plantas produzem seu próprio alimento e energia para desenvolver-se. Para o seu crescimento necessitam essencialmente de energia solar e da presença de água e dióxido de carbono, $\text{CO}_{2(g)}$, além de outros fatores importantes associados, como a incorporação de nutrientes e a fertilidade do solo, por exemplo. A energia, denominada bioenergia, é então a energia armazenada nas ligações químicas existentes nos componentes estruturais da biomassa, e/ou dos componentes de reserva, proveniente dos processos fotossintéticos (BNDES, 2008) (CINELLI, 2012).

Sendo assim, a biomassa pode ser considerada uma fonte com potencial significativo para geração de energia. As diferentes transformações e reações realizadas na biomassa geram produtos energéticos. A Figura 2 apresenta os tipos de conversão existentes sobre as fontes de biomassa para a geração de potenciais energéticos (ANEEL, 2002) (GOLDEMBER, 2009).



Fonte: Elaborado a partir de MME, 1982.

Figura 2. Diagrama esquemático dos processos de conversão energética da biomassa (ANEEL, 2002).

As fontes de biomassa podem ser divididas em quatro grandes classes, vegetais não lenhosos, vegetais lenhosos, resíduos orgânicos e biofluidos. Atendo-se na classe de vegetais não lenhosos, encontram-se os sacarídeos, e os amiláceos que apresentam potencial para produção de etanol. No caso dos sacarídeos, como a cana-de-açúcar, a conversão ocorre por meio da fermentação, portanto a fermentação ocorre em substratos ricos em açúcare e a obtenção de álcool ocorre por meio da fermentação unicamente (FELTRAN, 2010).

Com relação às culturas amiláceas empregadas na produção de álcool, apresenta uma etapa adicional e anterior a fermentação. O amido presente na composição deve passar pelo processo de hidrólise, para o desprendimento de açúcares, para então ser fermentado. As culturas amiláceas possuem o amido como principal constituinte, o qual é o carboidrato

encontrado na composição de culturas como a batata-doce e o milho, entre outras (SILVEIRA, 2008) (FELTRAN, 2010).

O etanol pode ser produzido de várias matérias-primas agrícolas, desde que contenham carboidratos fermentáveis, cuja composição é essencialmente açúcares e amido (PIMENTEL e PATZEK, 2005) (FELTRAN, 2010).

Adicionalmente, o etanol é fruto da biomassa e pode ser obtido a partir da fermentação. A fermentação pode ocorrer diretamente na biomassa rica em açúcares, os sacarídeos, como a cana-de-açúcar. No Brasil a produção de álcool encontra-se centralizada na cana, fato que contribui com a monocultura e destaca a importância de estudar outras fontes de biomassa com potencial para produção de álcool biocombustível. Outra forma de obtenção do álcool é realizando a conversão de amido em açúcar, fazendo-se uso da hidrólise ou sacarificação. As fontes de biomassa usadas neste caso são as culturas ricas em amido, as amiláceas (PIMENTEL e PATZEK, 2005) (FELTRAN, 2010).

A principal matéria-prima amilácea utilizada nos Estados Unidos para a produção de álcool é o milho, porém esta espécie apresenta restrições, como o baixo valor do balanço energético, vulnerabilidade a estresses ambientais além da necessidade de elevado uso de insumos. Uma das grandes desvantagens do milho e da cana-de-açúcar é que essas fontes competem na indústria alimentícia humana e animal (SHAPOURRI *et al.*, 1995) (SHAPOURRI *et al.*, 2002) (PIMENTEL e PATZEK, 2005).

Assim, para a segurança de uma melhor matriz energética, faz-se necessário, adotar estratégias para a produção de etanol a partir de matérias-primas alternativas. Desta forma, culturas como a batata-doce, que possui em sua composição elevado teor de açúcares e amido, destaca-se como sendo uma cultura com grande potencial produtivo e energético, além da facilidade de adaptação ao clima tropical e sub-tropical típico do Brasil (MATTOS, 1987)

3.2.1 Batata-doce

A batata-doce, *Ipomoeas batatas* é uma espécie de elevado valor econômico e alimentício e pode ser considerada uma das fontes de segurança alimentar de inúmeras populações rurais como cultura de subsistência, principalmente daquelas situadas em regiões pobres. Trata-se de uma cultura rústica e adaptada às condições tropicais e subtropicais e com grande potencial para o desenvolvimento tecnológico, sendo originária das regiões tropicais da América Central e do Sul (EMBRAPA, 2004).

Em 2006 a China destacava-se na produção de batata-doce, como maior produtor mundial com mais de 4,7 milhões de hectares cultivados, atingindo uma produtividade média de 21,3 ton.ha⁻¹ de raízes. O continente africano ocupava o 2º lugar como produtor, porém com baixa produtividade em torno de 4,4 ton.ha⁻¹ (FELTRAN, 2010).

O Brasil ocupa o décimo lugar na produção de batata-doce. A quantidade produzida, em 2006 atingiu valores em torno de 498.046 ton.ano⁻¹, com área plantada de 43.959 hectares e produtividade média de 11.542 kg.ha⁻¹ (FELTRAN, 2010).

Outras características da batata-doce, que a torna atrativa para o emprego na produção de etanol é sua rusticidade, em função da baixa necessidade de uso de insumos e alta produtividade de energia por área. Com boa adaptação às condições de solo e clima diversificado no Brasil (SILVEIRA, 2008).

Visando a produção de etanol, a batata-doce destaca-se por ser um alimento energético apresenta os valores nutricionais presentes na composição. Após a colheita, no estado *in natura*, apresenta cerca de 30% de matéria seca que contém em média 85% de carboidratos, cujo componente principal é o amido (Tabela 2) (EMBRAPA, 2004).

Tabela 2. Composição média em 100 gramas de matéria fresca de batata-doce, (Adaptado de EMBRAPA, 2004).

Componente	Unidade	Valor
Umidade	%	70
Carboidratos Totais	g	26,1
Proteína	g	1,5
Lipídeos	g	0,3
Cálcio	mg	32
Fósforo	mg	39
Ferro	mg	0,7
Fibras digeríveis	g	3,9
Energia	kcal	111

Observa-se que a batata-doce apresenta o carboidrato como o componente principal e em maior quantidade quando comparado aos outros componentes que o tubérculo apresenta (EMBRAPA, 2004).

A batata-doce tem como componente principal os carboidratos, constituídos por amido, que representa a reserva energética da planta (EMBRAPA, 2004).

Os vegetais obtêm seu próprio alimento, pelo processo da fotossíntese, através do qual produzem energia para seu desenvolvimento e sobrevivência. Quando não se utilizam de toda a energia que produzem o excesso é armazenado como reserva. Os vegetais armazenam de diferentes maneiras de acordo com os produtos sintetizados, dependendo da bioquímica de ação, por exemplo, quando a reserva é açúcar o tipo de planta característica são os sacarídeos, assim como, as amiláceas armazenam amido como, a batata-doce. Ambos os tipos de vegetais citados são empregados na produção de etanol biocombustível. As plantas oleaginosas são armazenadoras de lipídeos e são usadas na obtenção de biodiesel (SILVEIRA, 2008) (CINELLI, 2012).

Particularmente, o amido é um dos polímeros mais abundantes da natureza, e depois da celulose, é o principal carboidrato sintetizado pelas plantas. É um dos componentes mais variáveis da raiz, em função da variedade, maturidade ou armazenamento, sendo assim o maior responsável pela variação da composição química observada (VIEILLE e ZEIKUS, 2001) (SILVEIRA, 2008) (SILVA, 2009) (FELTRAN, 2010).

Uma das características importantes da batata-doce é que durante o tempo de estocagem, após a colheita, parte do amido se converte em açúcares solúveis, atingindo de 13,4 a 29,2% de amido e de 4,8 a 7,8 % de açúcares totais redutores, fato que torna a batata-doce bastante interessante, visto que os açúcares são fermentados para a produção de etanol (MIRANDA *et. al.*, 1995).

O amido é composto inteiramente por monômeros de D-glicose (Figura 3), é acumulado nos vegetais na forma de grânulos insolúveis, os quais são compostos basicamente de dois polissacarídeos muito semelhantes, a amilose e a amilopectina, em proporções que variam entre as diferentes espécies de origem e de acordo com o grau de maturação da planta (RABALHO, 2002) (SILVA, 2009).

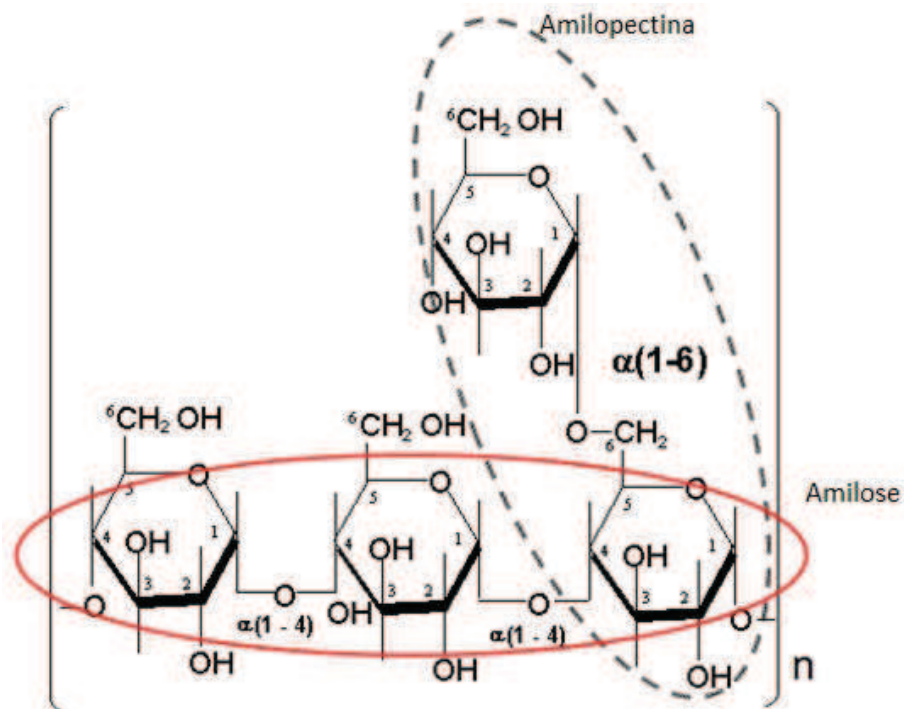


Figura 3. Representação molecular dos polissacarídeos contidos no amido (BOBBIO, 2003).

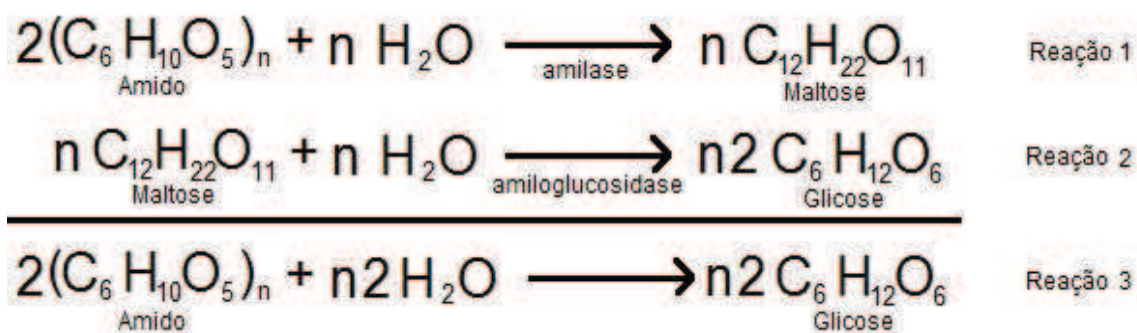
O amido é composto por dois tipos diferentes de polissacarídeos; amilose e a amilopectina; que apresentam conformação espiraladas, separáveis entre si, cujo monômero em comum é a glicose. A amilose é um polímero essencialmente linear e solúvel em água e caracterizado pelo tipo de ligação α -1,4, devido a união entre monômeros. Em contrapartida a amilopectina é insolúvel já que se trata de um polímero altamente ramificado, sendo constituído por cadeias de amilose ligados a pontos de ramificação característico das ligações α -1,6 entre monômeros de glicose (REGULY, 2000) (AEHLE, 2007) (SCIPIONI, 2011).

Com a finalidade de produzir etanol, o amido presente na batata-doce, deve ser convertido primeiramente em açúcar, para então ser fermentado por leveduras, resultando como produto final o biocombustível. Este processo é chamado de hidrólise ou sacarificação (RABALHO, 2002).

3.3 Hidrólise

O amido quando submetido à hidrólise (sacarificação), decompõem-se em açúcares menores. O processo de sacarificação converte o amido em uma mistura de glicose, maltose e dextrinas.

A glicose, dentre os constituintes da hidrólise, é a forma mais favorável para que o açúcar seja fermentado. A maltose e a dextrina, são menos assimiláveis pelo fermento, visto que possuem, em função da cadeia carbônica, maior impedimento histórico, dificultado assim a assimilação das leveduras. A dextrina é composta de duas moléculas de glicose unidas e as dextrinas são oligossacarídeos com cadeia de 3 a 7 monômeros de glicose. Genericamente, a hidrólise apresenta etapas reacionais apresentadas a seguir (AMARAL, 2007) (SCIPIONI, 2011).



A reação de decomposição do amido consiste numa etapa muito lenta, visto que o amido é uma substância estável. Portanto a reação de hidrólise ocorre na presença de catalisadores capazes de favorecer a quebra das ligações, para haver a liberação de açúcares. O processo pode ser via química ou enzimática (CEREDA, 1986).

3.3.1 Hidrólise Ácida

A degradação do amido pode ser realizada sob o uso de ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico e perclórico. As características principais do método é que o custo é baixo, quando comparado ao custo das enzimas, e o tempo relativo é menor, porém acarreta alguns inconvenientes, tais como a corrosão de equipamentos, necessidade de correção do pH da solução açucarada, destruição parcial dos açúcares e formação de açúcares não fermentáveis (CEREDA, 1986) (REEVE, 1992) (AMARAL, 2007) (HASHEM, 2010).

3.3.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática possui maior eficiência, pois estes micro-organismos são empregados especificamente para promover a quebra de determinadas ligações. Apresentam

um custo elevado e o tempo relativo do processo é maior. Dentre as enzimas capazes de hidrolisar o amido destacam-se a α -amilase, a β -amilase e a amiloglicosidade (GROSH, *et. al.*, 2009).

De modo geral as enzimas hidrolases, ou seja, as enzimas responsáveis pela hidrólise do amido são divididas entre duas classes de acordo com a forma de ação, podendo ser do tipo endoenzimas e exoenzimas (BRENDA, 2011).

As endoenzimas, como a α -amilase, atuam em toda a cadeia do polissacarídeo e produzem açúcares do tipo glicose, maltose e dextrina, dentre eles a glicose é o açúcar na forma ideal para fermentar. A α -amilase atua catalisando e clivando as ligações predominantemente α -1,4 e apresenta maior fluidez quando são elevadas ao ponto de gelatinização do amido, com diminuição da opacidade e viscosidade. É uma enzima relacionada a vários processos industriais, como panificação e produção de álcool (APAR *et. al.*, 2003) (AEHLE, 2007). Estas enzimas atuam em sinergismo com as enzimas do tipo exo, visto que a ação das endoenzimas favorecem um aumento de extremidades de cadeia para que as enzimas como a amiloglicosidade possam ter maior variedade de extremidades aptas a serem clivadas para a liberação de glicose.

As exoenzimas, como a β -amilase e a amiloglicosidade, atuam nas extremidades das cadeias de amilose e amilopectina, sendo que a enzima amiloglicosidade hidrolisa as ligações α -1,4 produzindo glicose e, lentamente ligações α -1,6, no amido. A dextrina e a maltose, liberadas pela ação da α -amilase, podem ser degradadas pela amiloglicosidase e como resultado há liberação de glicose desta forma, as enzimas atuam juntas na degradação do amido. A enzima amiloglicosidase possui ação contínua e tem uso na produção de xaropes (POLAKOVI e BRYJAK, 2003) (CARVALHO, 2008).

Ainda no processo de hidrólise o amido pode ser geleificado. A gelatinização do amido ocorre para que haja a hidratação do amido. Esta etapa pode ser acelerada mediante ao aquecimento do meio, para melhorar o acesso entre o amido e os agentes hidrolisantes. Também é conhecida como pré-hidrólise sendo fundamental para obtenção de um bom rendimento do processo (NIBA, 2005) (HUBER, 2005).

A sacarificação do amido, ou seja, o processo de hidrólise é importante, pois o mosto açucarado resultante é destinado a fermentação visando a produção de álcool.

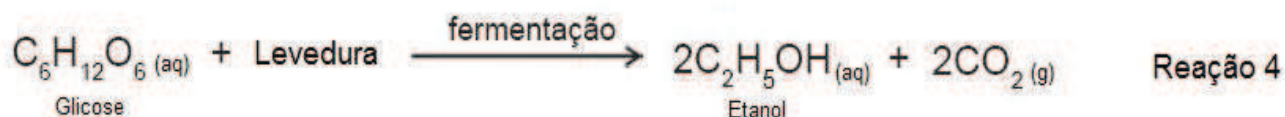
3.4 Fermentação

A fermentação para produção de etanol é dividida basicamente em dois processos, fermentação direta e indireta. O primeiro se faz pela utilização da fermentação direta dos açúcares existentes nas matérias primas, como a cana, melaço, caldo de sorgo. O segundo processo decorre da fermentação indireta das matérias primas, que tenham características amiláceas ou celulósicas como grão de cereais, mandioca, batata-doce e bagaço de cana (DERRINGER, 1980) (SANTANA, 2007) (CARDONA e SANCHEZ, 2007).

O amido é fonte de carbono em muitos processos fermentativos inclusive na produção de etanol para fins industriais. Porém este não é assimilado diretamente pelas leveduras, sendo necessária uma hidrólise desta matéria-prima, para obtenção da glicose, maltose e outros açúcares assimiláveis pelo micro-organismo (BRINGHENTI, 2004).

Entre os açúcares fermentáveis pelas leveduras estão os monossacarídeos glicose, frutose, manose e galactose, bem como os dissacarídeos maltose e sacarose e os trissacarídeos rafinose e maltotriose. Polissacarídeos como amido e celulose não são metabolizados por leveduras (RUSSEL, 2003).

A ação dos agentes fermentativos ocorre devido à necessidade de gerar energia para a sua sobrevivência. Desta forma, para o desenvolvimento das leveduras o carbono oferecido deve estar na forma de mono ou dissacarídeos. Os micro-organismos consomem o carbono para a produção de ATP e como consequência a molécula de glicose é transformada em álcool com desprendimento de $\text{CO}_2(\text{g})$ (BAI, *et. al.*, 2008). Portanto os açúcares liberados a partir da hidrólise do amido são fermentados por leveduras com a finalidade de produzir álcool. A reação envolvida no processo de fermentação visando à produção de etanol está apresentada conforme a reação 4 (SOLOMONS, 1999).



A fermentação é o processo posterior à hidrólise do amido, a qual ocorre sem a presença de oxigênio. Em relação ao ambiente fermentativo, as leveduras se desenvolvem em ampla faixa de temperatura, com intervalo ótimo próximo aos 36°C (KWIATKOWSKI *et. al.*, 2006). O pH e os limites de ação encontram-se em 2,2 e 8,0 (SANTANA *et. al.*, 2003).

A fermentação é uma transformação bioquímica provocada num substrato (açúcar) por fermento vivo (leveduras). No Brasil, o setor alcooleiro utiliza as leveduras do gênero *Saccharomyces*, com predominância na espécie *saccharomyces cerevisiae*. Nas indústrias produtoras de etanol são usadas leveduras de panificação prensadas e secas, ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (BELLUCO, 2001) (BRINGHENTI, 2004).

Essas leveduras são largamente utilizadas na indústria alimentícia na produção de pães e massas, sendo disponibilizadas no mercado por algumas marcas duas versões do fermento pó e em tablete.

3.5 Álcool

Atento ao desenvolvimento de tecnologias, o Brasil foi pioneiro no emprego do etanol como biocombustível, como primeiro país a instituir um programa governamental para a produção de etanol, conhecido como PROÁLCOOL (GOLDEMBERG, 2009).

Na década de 70, com a elevação dos preços do petróleo somada ao risco de superprodução do açúcar, fez-se necessário adotar medidas a fim de resolver tanto a crise do petróleo quanto a do açúcar. Desta forma o governo federal instituiu o Programa Nacional do Álcool, mediante ao Decreto 76.593 de 14/11/1975, firmando pelo então presidente Ernesto Geisel (BNDES, 2008).

De acordo com as normas de especificação da Agência Nacional de Petróleo, ANP, o etanol pode ser empregado como biocombustível quando em seu estado puro hidratado, ou ser adicionado em até 25% na gasolina, nos dias atuais (Portaria MAPA n° 105 DOU 1/3/2013) (MAPA, 2013).

O etanol pode ser utilizado como combustível em motores de combustão interna com ignição por centelha (ciclo Otto) de duas formas: anidro, em mistura com a gasolina; ou hidratado, comercializado via bombas específicas nos postos de abastecimento, em veículos movidos exclusivamente a etanol e em veículos bicombustível, também conhecidos como flex (BNDES, 2008) (INPI, 2010).

Portanto o advento dos carros flex alavancou em muito o consumo de álcool mostrando também uma real necessidade em buscar novas alternativas na produção de álcool que não ficasse restrito apenas na cana de açúcar (ANFAVEA, 2011) (SANDIFFIO e FURTADO, 2012).

O álcool como produto não é utilizado exclusivamente como biocombustível, sua utilização é muito ampla. O álcool de batata-doce apresenta excelente qualidade podendo ser utilizado na produção de cosméticos. O destaque fica por conta do futuro, como no emprego do elemento gerador de energia elétrica em células a combustíveis, equipamentos com eficiência energética superiores aos motores de combustão interna, além da elaboração de seus derivados e subprodutos como: amida, butila, etila, vinila, borrachas sintéticas, PVC e compostos plásticos em substituição a diversos elementos hoje provenientes do petróleo (MARCOCCIA, 2007).

A vantagem do emprego do etanol biocombustível é a possibilidade de um balanço energético favorável, em relação à emissão e absorção de $\text{CO}_2(\text{g})$ um dos gases causadores do efeito estufa. O ciclo é considerado fechado (Figura 4), pois há a liberação de gás carbônico, $\text{CO}_2(\text{g})$, como produto da combustão, entretanto também ocorre a absorção de $\text{CO}_2(\text{g})$ atmosférico, visto que para o crescimento e produção da biomassa ocorre a fixação de gás carbônico como fonte de carbono na respiração. Portanto o processo da fotossíntese compensa o que é liberado pela combustão do etanol, no emprego como biocombustível (SCHUCHARDT, 2001).

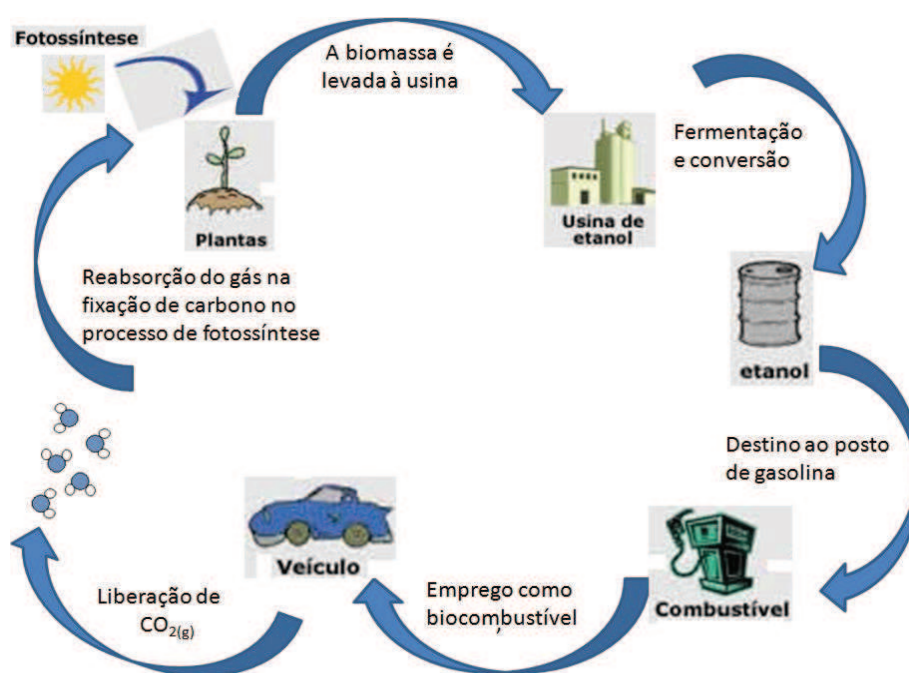


Figura 4. Representação esquemática do ciclo fechado de produção de etanol, adaptado (National Ethanol Vehicle Coalition).

Outra vantagem é que as fontes de biomassa quase não contêm enxofre na sua composição, principal componente gerador de chuvas ácidas, portanto do ponto de vista ambiental a utilização do etanol biocombustível produz menos impacto para o efeito estufa e alterações climáticas. Desta forma o álcool garante a sua importância no mercado devido ao fato de ser considerado um combustível mais limpo e de ciclo fechado (PIMENTEL e PATZEK, 2005). O conceito de reciclar o gás carbônico é que torna os biocombustíveis, produzidos a partir de biomassa vegetal, uma área de crescentes estudos (CORTEZ, 1997).

Apesar de considerar o ciclo do álcool fechado, não é completamente verdadeira a afirmação, visto que existem outros fatores que muitas vezes não são considerados, tais como o transporte da biomassa e do biocombustível, a adição de adubos e agrotóxicos na planta, uso de aditivos químicos para a neutralização do álcool e aditivos orgânicos ao biocombustível.

Atualmente a substituição gradual do petróleo por fontes de energia alternativas oriundas de biomassas renováveis é vista como um importante contribuinte para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e eficaz em relação aos problemas ambientais (RAGAUSKAS *et. al.*, 2006). O mundo vive uma época de mudanças, estando em curso uma verdadeira mudança de paradigma, transformando uma sociedade altamente dependente de combustíveis fósseis em uma baseada na utilização de recursos renováveis, acompanhada de um modelo econômico mais sustentável (CLARK *et al.*, 2006) (HOLM-NIELSEN *et. al.*, 2006).

Com perspectivas de se colaborar com as mudanças energéticas de nosso planeta este trabalho visualiza-se o estudo da eficiência da produção de etanol de diferentes genótipos de batata-doce.

4. METODOLOGIA

4.1 Local do Experimento

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal. Os clones de batata-doce empregados são provenientes do banco de germoplasma do Departamento de Agronomia, no Câmpus CEDETEG, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR.

4.2 Batata-doce

Oito genótipos de batata-doce foram selecionados em função de produtividade, e adaptação ao clima local, sendo denominados (UGA 92, UGA 77, UGA 49, UGA 11, UGA 08, UGA 07, UGA 06 e UGA 05). Análise do teor de água, açúcares redutores e amido foram estudados nos oito genótipos. Em função dos resultados, dois genótipos foram selecionados para o processo fermentativo, ou seja, para a produção de álcool.

4.2.1 Teor de umidade

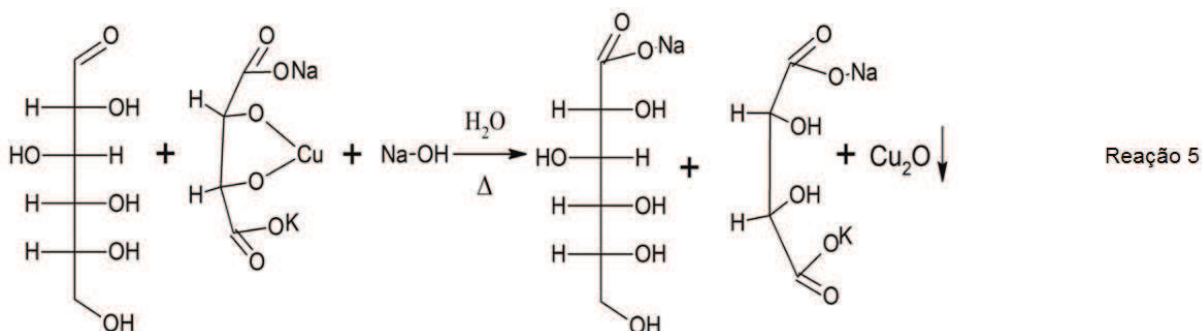
As raízes dos clones de batata-doce colhidas foram identificadas, selecionadas, lavadas, pesadas e raladas. Em seguida as amostras foram acondicionadas em estufa de secagem, da marca QUIMIS, modelo Q3171-22, cuja secagem foi realizada à 65°C por 72 horas. Após a secagem as amostras foram trituradas e transformadas em farinha de batata-doce.

Ressalta-se que a farinha de batata-doce é que foi empregada no desenvolvimento da pesquisa. Foi determinada a umidade, massa seca, massa fresca, teor de açúcares redutores e amido. Foram escolhidas duas amostras eleitas para os ensaios do processo fermentativo e assim obter o etanol. Os critérios de escolha foram determinados pelo teor de açúcares redutores e de amido contido em cada cultivar de batata-doce.

4.2.2 Teor de Açúcares Redutores

A metodologia empregada é a do Instituto Adolf Lutz, IAL, Método de Lane-Eynon com os reagentes de Fehling (IAL, 1976) (DEMIATE, et. al. 2002).

A batata-doce apresenta em sua composição açúcares, motivo pelo qual este cultivar é atrativo no emprego visando à produção de álcool. A determinação de açúcares redutores pode ser realizada pelo método analítico de titulação de Lane-Eynon, do Instituto Adolf Lutz, IAL. O método, reação 5, consiste na redução cobre $\text{Cu}^{2+}_{(aq)}$, azul característico do íon cúprico para $\text{Cu}^{+}_{(aq)}$, na forma de óxido cuproso como resultado há formação de um precipitado de óxido de cobre, cor tijolo, que indica o ponto final da titulação.



Foram preparadas duas soluções Fehling A e Fehling B. A solução alcalina de Fehling A é composta de sulfato de cobre e hidróxido de sódio e o Fehling B é composto do sal duplo de tartarato de sódio e potássio, que atua como ligante para os íons de cobre em solução. Quando os reagentes de Fehling A e B são aquecidos oxidam os açúcares assim o cobre foi reduzido, formando o precipitado da titulação (TAVARES *et. al.*, 2010).

As soluções de Fehling A e B são padronizadas com D-glicose, de acordo com o procedimento apresentado na figura 5.

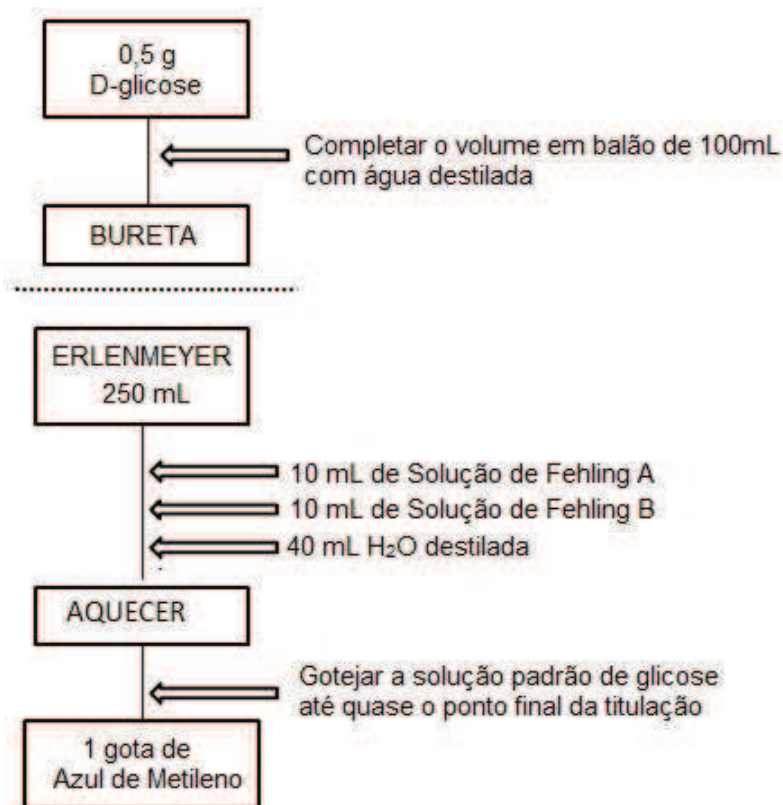


Figura 5. Fluxograma da titulação usada para calcular o Fator dos reagentes Fehling A e B.

Ao final da padronização dos reagentes de Fehling foi possível obter o valor do fator de Fehling. Este resultado foi usado no cálculo para a determinação dos açúcares redutores presentes nas amostras de batata-doce.

Para a determinação dos açúcares redutores presentes na composição dos diferentes genótipos de batata-doce estudados, o procedimento da titulação foi o mesmo, em que as amostras foram inseridas como analito e gotejadas sobre os reagentes até o final da titulação. O volume gasto foi anotado juntamente com a massa de farinha de batata-doce empregados nos cálculos.

Cada amostra de batata-doce analisada foi pesada, aproximadamente 10 g de farinha, em seguida foi adicionada água destilada até completar o volume de 100 mL em balão volumétrico. Foi realizada a filtração, já os açúcares são solúveis. E então, o filtrado, foi transferido para a bureta, de onde foi realizado o gotejamento sobre os reagentes de Fehling A e B em ebulição, os quais foram previamente padronizados, até atingir o ponto final da titulação. O procedimento realizado para determinação dos açúcares redutores, AR, presentes nos diferentes cultivares de batata-doce, foi apresentado na figura 6.

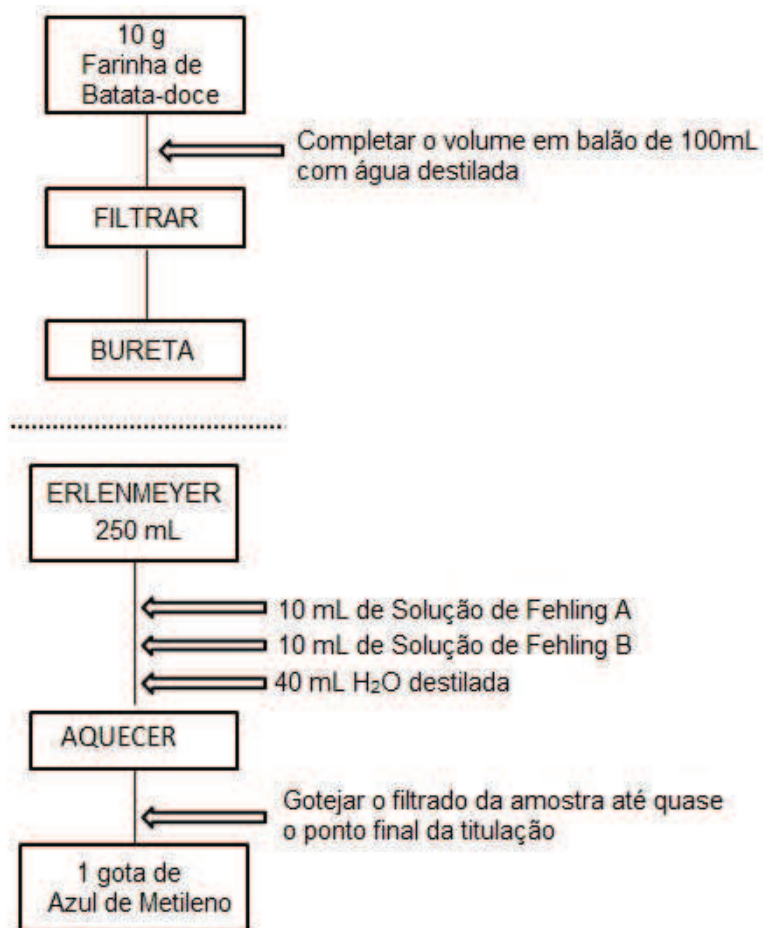


Figura 6. Fluxograma da titulação de açúcares redutores.

Os resultados de massa inicial de farinha de batata-doce, volume de amostra gasto na titulação e a padronização dos reagentes de Fehling A e B foram empregados para o cálculo do teor de açúcares redutores presentes nas amostras de batata-doce estudadas.

4.2.3 Teor de Amido

No método do teor de amido também foi realizado a titulação com os reagentes de Fehling, pois após a digestão ácida em micro-ondas em meio de ácido clorídrico (CEREDA e VILPOUX, 2009) (GONÇALVES *et. al.*, 2009), o amido convertido em açúcares foi neutralizado com hidróxido de sódio. Em seguida o sistema foi levado ao procedimento para o método que determina os açúcares redutores.

A massa inicial da farinha de batata-doce, o volume gasto na titulação e o fator dos reagentes de Fehling A e B foram empregados no cálculo que determinou o teor de amido presentes nos genótipos de batata-doce avaliados.

4.3 Processo de Obtenção de Álcool

O processo fermentativo é compreendido como um conjunto de etapas realizadas para obter o etanol das amostras de batata-doce, que são UGA 05 e UGA 77, apresentado na figura 7.

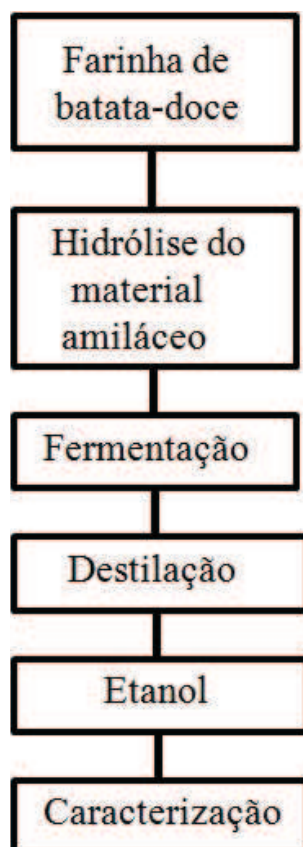


Figura 7. Etapas compreendidas no processo fermentativo.

Primeiramente após o processo de secagem, foi possível obter a farinha de batata-doce, pois é desta forma em que os genótipos de batata-doce foram empregados nas análises preliminares de umidade, açúcares redutores e amido, bem como no uso no processo de obtenção do álcool.

Este material amiláceo, rico em amido, foi submetido à hidrólise enzimática para a quebra das ligações do tipo α 1,4 e α 1,6 presentes no amido, como consequência há liberação de açúcares, como glicose, maltose (dois monômeros de glicose) e dextrinas (3 a 7 monômeros de glicose). A hidrólise é um processo que ocorreu em condições especiais de temperatura e pH para cada enzima, que atuam em sinergismo uma em relação a outra. A medida que açúcares maiores são liberados pela atuação da enzima α amilase, mais

extremidades de glicose são liberadas para ocorrer a clivagem em função da atuação da enzima amiloglucosidade. Como resultado um mosto açucarado é formado.

O mosto formado foi autoclavado para esterilização de qualquer micro-organismo que possam influenciar a fermentação. A adição de leveduras, das variedades em tablete e em pó, *Saccharomyces cerevisiae* foram adicionadas ao mosto para dar início ao processo fermentativo. Ao final dos tempos de estudo, a levedura consumiu os açúcares formados pela hidrólise e conseqüentemente houve a conversão e produção de álcool com liberação de $\text{CO}_{2(g)}$.

O álcool formado, por meio da fermentação dos açúcares sob a ação da levedura, pode ser isolado e purificado pelo processo de destilação. As amostras de álcool destiladas foram levadas para a caracterização em função da determinação do teor alcóolico, em °GL. Os resultados foram tratados por meio do delineamento estatístico de dois fatoriais 2^2 e 2^3 de planejamento experimental.

4.3.1 Hidrólise

A transformação de amido em açúcares ocorreu pelo processo conhecido como hidrólise ou sacarificação. Esta etapa é de suma importância, visto que a quantidade de açúcares livres é diretamente proporcional à conversão e produção em álcool. A hidrólise empregada foi enzimática, sob o uso de enzimas purificadas da Sigma-Aldrich (α -amilase e amiloglucosidase).

Cada enzima foi adicionada ao meio em condições especiais para o seu desenvolvimento, melhorando a especificidade (PAVLAK, 2011). O meio de hidrólise empregado foi obtido com a proporção de 3,0 g de farinha de batata-doce para 50,0 mL de tampão de McIlvaine, em pH 5,6. Estas condições do tampão são usadas em alguns trabalhos na determinação da atividade enzimática, por este motivo este foi o meio escolhido onde foram realizados os ensaios de hidrólise (STROPARO, 2011).

O tampão foi composto pela combinação de soluções de ácido cítrico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e de Na_2HPO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, o tampão foi empregado para aumentar a atividade enzimática das enzimas. A proporção de enzimas usadas para cada grama de farinha de batata-doce foram 750 U e 0,5 U (unidades), equivalente a $13 \mu\text{L}$ e $57 \mu\text{L}$ de α -amilase e amiloglucosidase, respectivamente (STROPARO, 2011). Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica.

A hidrólise foi realizada sob elevadas temperaturas, em banho termostático da marca QUIMIS, modelo banho maria, 109.

Primeiramente ocorreu a geleificação do amido na temperatura de 90°C durante aproximadamente 15 minutos. Em seguida, com uma micropipeta, foi inserida a enzima α -amilase ($13\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de enzima) no meio formado entre a farinha de batata-doce e o tampão, a temperatura de trabalho foi mantida em 90°C, durante 1 hora, com intervalos de 15 minutos para a agitação e homogeneização do meio.

O meio foi resfriado e o pH ajustado para 4,5 com HCl $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Estas condições preveem uma melhor atuação da segunda enzima. A temperatura do banho foi ajustada para 60°C com o intuito de melhorar a ação da enzima amiloglucosidase ($54\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de enzima), também na condição de 1 hora de banho e intervalos de 15 minutos para a agitação, como apresentado na figura 8 (PAVLAK, 2011).

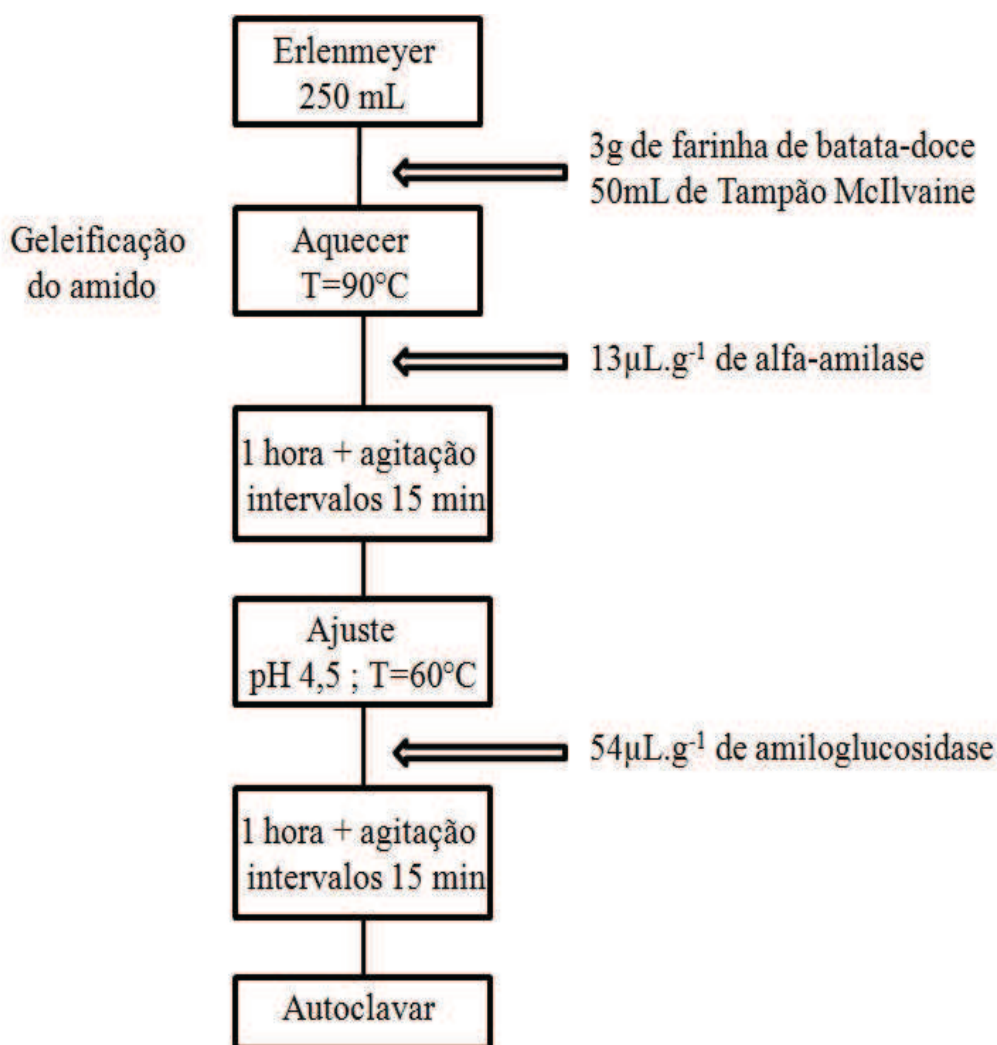


Figura 8. Fluxograma da hidrólise.

Ao final da hidrólise, o mosto açucarado formado, foi centrifugado. Como os açúcares são solúveis, somente o sobrenadante foi utilizado. O restante da farinha de batata-doce hidrolisado é bastante viscoso e se utilizado na fermentação prejudica o processo de destilação, por este motivo, foi descartado e usado o sobrenadante. Porém este resíduo pode ter aplicações na indústria na produção de ração animal.

4.3.2 Fermentação

Após o processo de hidrólise, gerou-se o mosto, que foi centrifugado em uma centrífuga Hettich Zentrifuger MIKRO 220R, em rotação de 2200 hertz durante oito minutos. Ao sobrenadante foi adicionada água destilada até completar o volume de 50,0 mL em um balão volumétrico.

O conteúdo foi homogeneizado e transferido para um erlenmeyer de 250 mL, o qual foi posteriormente vedado com papel kraft fixado com fita autoclavante e esterilizado em autoclave, onde se elevou a pressão em 1 atm e 120 °C, por 10 minutos, em autoclave vertical modelo CS da Primatec Autoclaves.

Ao final desta etapa o meio encontrava-se esterilizado e livre da ação de micro-organismos. Somente desta forma foi possível estudar somente a ação da levedura no processo de fermentação visando à produção de álcool.

Foi adicionado o fermento, *Saccharomyces cerevisiae*, na concentração de 8 g.L⁻¹, onde teve início o processo fermentativo. Ressalta-se que após a adição da levedura levou-se o sistema para agitação para homogeneização por 2 minutos a frequência de 10 rpm em uma mesa de agitação, em mesa agitadora Labstore, modelo 109.

As leveduras de estudo e os tempos de fermentação foram investigados. As leveduras empregadas são provenientes de dois tipos de fermento comercial, pó e tablete, da marca Fleishmann®.

Como o processo de fermentação ocorre anaeróticamente, todo o sistema foi desaerado com a passagem de nitrogênio gasoso, N_{2(g)}, durante 10 minutos. Somente após a desaeração as amostras foram levadas à estufa sob temperatura de 36°C durante os tempos de fermentação propostos de 72 e 96 horas.

4.3.3 Destilação

A cada final dos tempos propostos para a fermentação, as amostras foram retiradas da estufa e submetidas ao procedimento de destilação. A técnica de destilação permite que os compostos mais voláteis presentes na amostra sejam mais facilmente liberados na forma gasosa, permitindo assim, que o álcool fosse destilado a temperatura próxima de seu ponto de ebulição, temperatura esta inferior ao ponto de ebulição da água. Ressalta-se que a temperatura foi de aproximadamente 75°C, levando em consideração a altitude da cidade onde se realizou os estudos.

O álcool destilado foi recolhido em um balão em banho de gelo para garantir a sua estabilidade no estado líquido. As amostras destiladas dos diferentes ensaios foram identificadas e armazenadas em frascos com tampa mantidos em geladeira. As amostras destiladas foram levadas ao procedimento para a determinação do teor alcóolico em °GL. Cada ensaio realizado foi repetido em no mínimo duas vezes.

4.4 Triagem de Resultados

Uma primeira triagem de resultados foi testada, sob diferentes condições de destilação, sendo este o ponto crítico da pesquisa. Muitos testes foram elaborados e pela dificuldade inicial, os resultados foram apreciados de forma qualitativa (ou seja, observando o comportamento das amostras visualmente no momento experimental) para a produção da metodologia de estudo; em detrimento das amostras provenientes da destilação se comportar de forma suscetível a amplo quadro de erros experimentais, tais como tamanhos de mantas de aquecimento, balões e aparatos de destilação, forte influência da temperatura ambiente e pressão, viscosidade do mosto.

Para obter uma metodologia de ação foi necessário testar concentrações de leveduras, tempos de fermentação, ensaios diferentes de hidrólise variando a temperatura e pH e condições especiais para cada enzima, adequação do meio com suplementação nutritiva para o crescimento das leveduras e o tipo de levedura.

Finalmente foram escolhidos alguns fatores importantes como um todo para o processo de destilação, que foram: tempo de fermentação, adição de nutrientes para suplementação das leveduras, tipo de fermento (levedura) utilizada, em pó e em tablete, o comportamento de cada genótipo de batata-doce utilizada. Para tanto foram realizadas

medidas referentes a ensaios para dois planejamentos experimentais, primeiramente um fatorial 2^2 e fatorial 2^3 .

O delineamento estatístico analisou como resposta os resultados obtidos na determinação do teor de álcool produzido a partir do processo fermentativo em função das variáveis relacionadas.

4.5 Determinação do teor de álcool

O teor alcóolico do álcool destilado, das amostras destiladas provenientes do processo fermentativo, foi determinado conforme a norma NBR 13920.

De forma simplificada, o método consiste na construção de uma curva padrão de absorvância em função de concentrações conhecidas de álcool etílico.

Para esta análise utilizou-se soluções de dicromato de potássio, $K_2Cr_2O_7$, 10% (m/v), ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 e etanol absoluto, C_2H_5OH .

Para o preparo da solução padrão de etanol, colocou-se 0,190 mL de etanol absoluto em um balão de 50 mL e completou-se o volume com água destilada.

A partir desta solução padrão preparou-se 4 novas soluções (A) e um branco (B), em um tubo de ensaio de 20 mL, sendo elas:

- A1 – 1,0 mL da solução padrão e 4,0 mL de água destilada (referente a 3,0 mg etanol);
- A2 – 2,0 mL da solução padrão e 3,0 mL de água destilada (referente a 6,0 mg etanol);
- A3 – 3,0 mL da solução padrão e 2,0 mL de água destilada (referente a 9,0 mg etanol);
- A4 – 4,0 mL da solução padrão e 1,0 mL de água destilada (referente 12,0 mg etanol);
- B – 5,0 mL da água destilada.

Nestas soluções foi adicionado lentamente pela parede do tubo 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, e após um minuto adicionou-se 1,0 mL da solução de dicromato de potássio. Levou-se o tubo para agitação em agitador, marca MARCONI, modelo MA-162/1.

Após a o resfriamento em temperatura ambiente, 1,0 mL de cada solução foi adicionada em uma cubeta de quartzo de 1 cm^3 , e levada para análise em espectrômetro de UV-Vis da Spectrum UV-Vis, spectrophotometer SP 2000 UV, no comprimento de onda fixo em $\lambda = 600\text{ nm}$.

A leitura observada no espectrofotômetro de UV-Vis, em relação ao branco, no mesmo comprimento de onda foi realizada sobre a amostra destilada, em que empregou-se

0,20 mL de destilado diluídos para 5,0 mL. A adição de ácido sulfúrico e de dicromato de potássio 10% foi realizado conforme o descrito anteriormente.

Com base na curva de calibração gerada e a leitura observada para as amostras destiladas, foi possível efetuar o cálculo para a determinação do teor alcóolico em °GL das amostras de álcool produzidas a partir dos genótipos de batata-doce. Este resultado, em °GL, foi utilizado como resposta nas análises estatísticas.

4.6 Planejamento Fatorial 2²

Após o processo de hidrólise, o meio açucarado foi suplementado com nutrientes com o intuito de melhorar a ação da levedura, ou seja, ao mosto foram adicionados fontes de nitrogênio, magnésio e zinco. Foi estudado se houve variação no °GL do álcool produzido em função da adição ou não de nutrientes, bem como o tempo de fermentação.

Com o intuito de melhorar o desempenho e a ação das leveduras, foi realizada a suplementação do meio fermentativo por meio da inserção de fontes de nutrientes e a cultivar de estudo empregada neste delineamento foi a UGA 05.

Na triagem de ensaios realizados foi observado que o tempo de fermentação apresentava influência na destilação do álcool produzido.

Na realização do planejamento fatorial 2², os experimentos foram realizados em função da variação do meio fermentativo, por meio da suplementação do mosto com nutrientes fontes de nitrogênio, magnésio e zinco em concentrações fixas de (NH₄)₂HPO₄ 0,30g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,25 g.L⁻¹ e ZnSO₄ 0,20 g.L⁻¹, respectivamente.

O planejamento experimental empregado foi com variação entre dois níveis para cada fator de estudo. O primeiro fator foi: **1** Tempo de fermentação, codificado em (-)72 e (+)96 horas e o segundo fator, **2** meio fermentativo, codificado em (-) sem adição e (+) com nutrientes.

Os ensaios foram randomizados, a tabela 3 apresenta o quadro de ensaios codificados para os níveis de variação entre os dois fatores de estudo e também apresenta a interação formada entre os fatores tempo/meio.

Tabela 3. Ensaios do planejamento fatorial 2².

Fator 1: Tempo: 72 horas(-), 96 horas (+)			
Fator 2: Meio: sem nutrientes (-), com nutrientes (+)			
Resposta: Teor Alcoólico, (°GL)			
Ensaio	1 Tempo	2 Meio	12 Tempo/meio
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

Os ensaios decodificados para as variáveis foram agrupados para melhor visualização dos ensaios realizados, conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4. Combinação dos ensaios do planejamento 2².

Ensaio	1 Tempo	2 Meio
1	72 horas	sem nutrientes
2	96 horas	sem nutrientes
3	72 horas	com nutrientes
4	96 horas	com nutrientes

Os ensaios foram reproduzidos em regime de duplicata. Ao final das destilações, cada amostra foi devidamente identificada e armazenada em frascos com tampa mantidos em geladeira. Em seguida, cada amostra foi levada ao procedimento para a determinação do teor alcoólico. A análise estatística se deu pela média dos resultados obtidos para as duplicatas dos ensaios realizados.

4.7 Planejamento Fatorial 2³

No planejamento experimental 2³, além do tempo de fermentação também foi estudado se há variação no °GL, do álcool produzido em função do comportamento dos

genótipos de batata-doce utilizados, UGA 05 e UGA 77. Outra variável relacionada com a produtividade de álcool é a levedura empregada no processo fermentativo, pois pode haver variação no °GL do álcool produzido em função da fermentação ocorrer sob a ação da levedura em pó e em tablete.

Para o planejamento fatorial 2^3 foi empregado o modelo para três fatores (variável, efeito) em dois níveis de variação, bem como a interação existente entre os efeitos.

Os fatores de maior interesse escolhidos foram: **1** tempos de fermentação codificados em (-) 72 e (+) 96 horas; **2** genótipos de batata-doce codificados em (-) UGA 05 e (+) UGA 77 e a terceira variável **3** foi investigado a ação do tipo de fermento codificados em (-) pó ou (+) tablete.

Os ensaios codificados para as variáveis relacionadas do planejamento fatorial 2^3 estão agrupadas conforme a tabela padrão de combinações e interações como apresenta a tabela 5.

Tabela 5. Ensaios do planejamento fatorial 2^3 .

Fator 1: Tempo: 72 horas(-), 96 horas (+)							
Fator 2: Genótipo: UGA 05 (-), UGA 77 (+)							
Fator 3: Levedura: Pó (-), Tablete (+)							
Resposta: Teor Alcoólico, (°GL)							
Ensaio	1 Tempo	2 Genótipo	3 Levedura	12	13	23	123
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Decodificando as variáveis, para uma melhor visualização dos ensaios realizados, com as combinações experimentais propostas para o estudo dos efeitos, os ensaios realizados foram descritos conforme apresenta a Tabela 6.

Tabela 6. Combinação dos ensaios do planejamento 2³.

Ensaio	1 Tempo	2 Genótipo	3 Levedura
1	72 horas	UGA 05	Pó
2	96 horas	UGA 05	Pó
3	72 horas	UGA 77	Pó
4	96 horas	UGA 77	Pó
5	72 horas	UGA 05	Tablete
6	96 horas	UGA 05	Tablete
7	72 horas	UGA 77	Tablete
8	96 horas	UGA 77	Tablete

Cada um dos ensaios foi realizado em duplicata e de forma randomizada. Após a fermentação nas condições de cada ensaio, as amostras destiladas foram submetidas ao procedimento para a determinação do teor alcóolico, °GL. Após esta caracterização, os resultados obtidos para as duplicatas foram apresentados pela média dos resultados empregados nas análises estatísticas.

O tratamento de dados estatísticos, tanto do planejamento fatorial 2², quanto para o planejamento fatorial 2³, foi realizado usando o programa Design Expert versão 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Batata-doce

Dentre os oito genótipos de batata-doce estudados, dois clones (genótipos) foram escolhidos para serem empregados no processo fermentativo para a produção de etanol. Para tanto, foram realizadas a determinações de teor de água, e sobre a composição nutricional em função da quantidade de açúcares redutores e de amido presente nas raízes tuberosas avaliadas.

5.1.1 Teor de Umidade

Os resultados obtidos para a perda de água após o processo de secagem dos genótipos de batata-doce de estudos estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Dados de teor de massa fresca, seca e água dos genótipos de batata-doce.

Genótipo	Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)	% de Água
77	749,59	208,79	72,15
49	694,75	194,42	72,02
11	1174,79	329,66	71,94
05	889,03	252,28	71,62
06	622,13	185,80	70,13
07	747,90	234,73	68,61
92	303,84	96,35	68,29
08	736,39	252,00	65,78

Os dados demonstram que há variação do teor de água presente em cada genótipo investigado. O intervalo de confiança para a média dos valores para perda de água, a partir da distribuição normal deve estar entre $68,56 < x < 71,57$, a 95% de confiança. Sendo assim os genótipos 77, 49, 11 e 5 estão acima do intervalo de confiança estabelecidos, assim como os genótipos 92 e 8 estão abaixo.

Estes resultados indicam que os valores diferem significativamente entre si. Entretanto, as amostras receberam o mesmo tratamento no campo como, solo, adubação e

irrigação. As diferenças de composição tornam importantes a determinação de açúcares redutores, AR e teor de amido, uma vez que podem até interferir na quantidade de álcool produzido.

5.1.2 Teor de Açúcares Redutores

O padrão primário de D-glicose inserido como analito no conteúdo da bureta foi gotejado nos reagentes de Fehling A e B para a padronização. O cálculo do fator de Fehling foi utilizando a equação 1.

$$F = \frac{V \cdot P}{100} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

F = Fator de Fehling;

V = Volume gasto na titulação;

P = Massa de glicose usada na padronização.

Obteve-se um valor para F de 0,0463. Para as amostras de farinha de batata-doce, o mesmo procedimento foi realizado, em que a amostra foi adicionada à mistura dos reagentes de Fehling A e B, onde foi gotejado até o final da titulação.

Desta forma a massa inicial da farinha de batata-doce bem como o volume gasto na titulação foram usados no cálculo de açúcares redutores em %, dado pela equação 2:

$$AR = \frac{100 \cdot A \cdot F}{V \cdot P} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

AR = Açúcares Redutores;

A = Diluição da amostra;

F = Fator de Fehling, padronização dos reagentes;

P = massa de amostra;

V = Volume em mL gastos na titulação.

Os resultados obtidos da determinação de açúcares redutores contido nas amostras estão apresentados na figura 9.

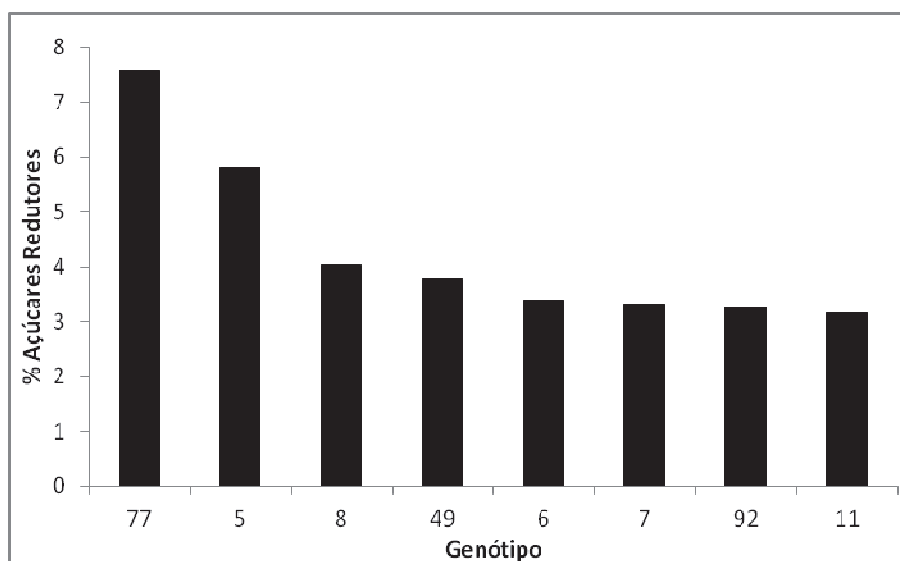


Figura 9. Teor de açúcares redutores presentes nos genótipos de batata-doce.

O teor de açúcar é um dado de importância, visto que as moléculas já se encontram na forma ideal para o processo fermentativo, os resultados (Figura 9) sugerem que as amostras UGA 77 e UGA 05 contém maior quantidade de açúcares na sua composição com valores de 7,58% e 5,81%, respectivamente. Por este motivo, ficou definido que estes clone de batata-doce foram empregados como amostras para a produção de etanol.

5.1.3 Teor de Amido

O amido pode ser convertido, após a hidrólise, em açúcar, o que torna a análise de amido fator importante na seleção dos materiais selecionados para o processo fermentativo. O cálculo do teor de amido presente nos genótipos estudados foi obtido a partir da equação 3.

$$\%Amido = \frac{250 \cdot F \cdot 0,9 \cdot 100}{V \cdot P} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

F = Fator de Fehling;

P = Massa da amostra;

V = Volume em mL gastos na titulação

0,9 = Fator de correção de açúcar para amido

Os resultados da determinação de amido dos genótipos de batata-doce estudados estão apresentados na figura 10.

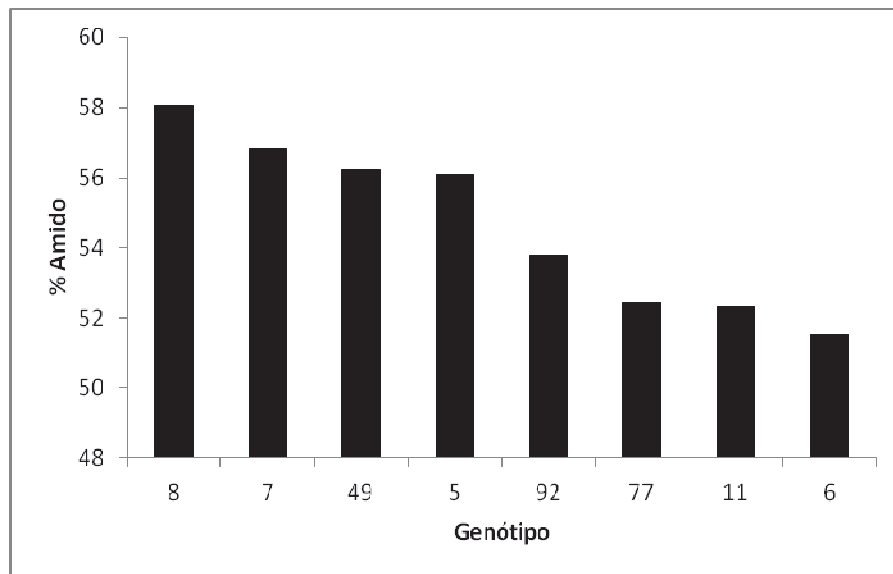


Figura 10. Teor de amido presente nos genótipos de batata-doce.

Os resultados da análise de amido presentes na composição nutricional das batatas-doce estudadas indicam que os genótipos mais ricos em amido são 08, 07, 49 e 05 apresentando valores de 58,06%, 56,82%, 56,23% e 56,10%, respectivamente.

Foram escolhidos os genótipos UGA 77 e 05 que foram estudados no processo de fermentação visando à produção de etanol. O genótipo 77 por apresentar maior teor de açúcares em sua composição e a 05 por apresentar valores bem relacionados entre os dois teores, tanto de açúcar quanto de amido, e por trabalhos paralelos utilizando-se do mesmo genótipo por outros alunos do grupo de pesquisa.

5.2 Triagem de Resultados

O primeiro clone a ser preliminarmente testado foi a UGA 05, de acordo com o mencionado no material e métodos para o teste de tempo de fermentação.

Amostras que tiveram o mesmo tratamento de hidrólise e fermentação nas mesmas condições de 8 g.L^{-1} , foram destiladas durante uma semana.

A porcentagem de álcool destilado em relação ao volume total do mosto está apresentada em função do tempo, como mostra a figura 11.

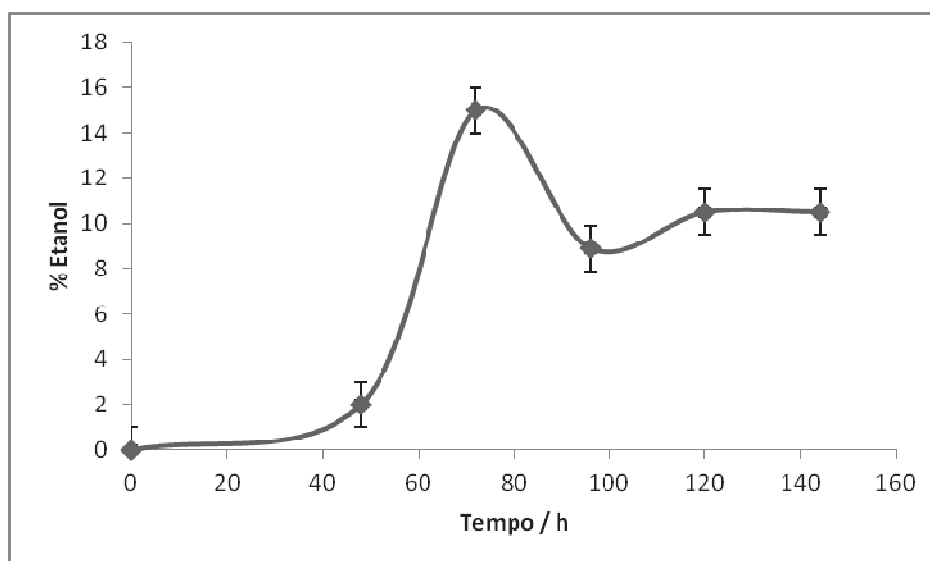


Figura 11. Obtenção de etanol via destilação do mosto após fermentação em diferentes tempos.

O gráfico da figura 11 mostra que a fermentação de etanol teve um pico de produção em 72 horas de fermentação.

O etanol produzido torna o meio inadequado para a sobrevivência das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Acredita-se que após este tempo as condições do mosto tornam-se inapropriadas para as leveduras, causando a diminuição da atividade até nova adaptação ao meio.

Portanto, em função deste comportamento, os tempos de fermentação de estudo foram fixados em 72 e 96 horas juntamente com o estudo estatístico das variáveis que podem interferir na produção de etanol, como a suplementação do meio visando a melhor ação da levedura, como estudado no planejamento fatorial 2^2 .

Outras variáveis de interesse foram usadas para avaliar se existem diferenças no comportamento fermentativo dos genótipos estudados e se o tipo de levedura empregada nas variedades pó e tablete podem apresentar diferenças no processo fermentativo. Estas variáveis foram analisadas no planejamento fatorial 2^3 .

As análises estatísticas foram realizadas por meio da mudança do teor de álcool das amostras destiladas, provenientes das combinações entre as variáveis que geraram diferentes ensaios realizados.

5.3 Determinação do Teor Alcólico

A curva de calibração gerada com os resultados do espectrômetro de UV-Vis obtida para as amostras em comprimento de onda $\lambda = 600$ nm foi apresentada na figura 12.

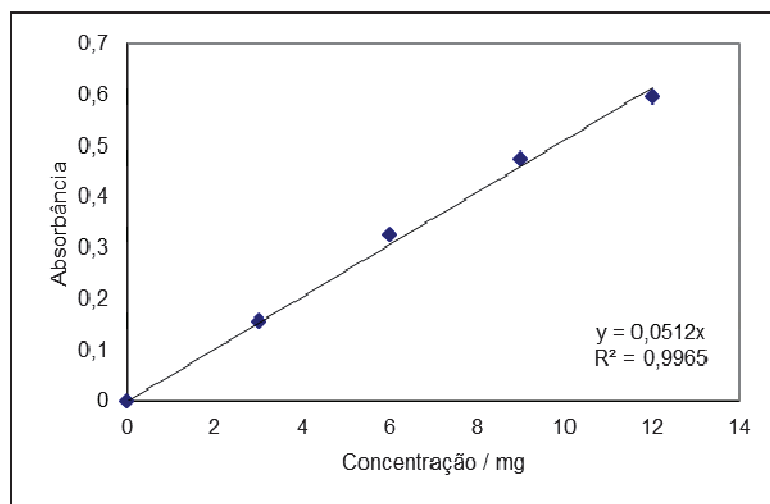


Figura 12. Curva de calibração para a determinação do teor alcólico obtida por meio do espectrômetro de UV-Vis.

As amostras de etanol obtidas da fermentação de batata-doce foram caracterizadas usando 0,02 mL de destilado do mosto igualmente diluído para 5,0 mL de água destilada. O mesmo procedimento da adição de ácido sulfúrico e de dicromato de potássio e leitura de espectrômetro de UV-Vis em 600 nm foi realizado em função do branco.

Os valores de absorbância obtidos foram colocados na regressão da curva padrão onde se obteve o valor de etanol em mg da alíquota, conforme a leitura na curva-padrão. Assim, o teor de álcool, em °GL foi encontrado utilizando as seguintes equações 4 e 5:

$$E = \frac{5000 \cdot E'}{0,7834 \cdot 1000} \quad \text{Equação 4}$$

Ou,

$$E = 6,323 \cdot E' \quad \text{Equação 5}$$

Onde,

E = teor de etanol na amostra, em mL / 100 mL (°GL)

E' = mg de etanol na alíquota, conforme leitura na curva-padrão

5000 = fator de conversão da alíquota de 0,020 mL para 100 mL

1000 = fator de conversão de mg para g

0,78934 = densidade do etanol a 20°C, em g/mL

A equação propõe a determinação do teor alcóolico das amostras destiladas em °GL, estes resultados foram empregado como resposta nas análises estatísticas.

5.4 Delineamento Estatístico

O delineamento estatístico proposto foi em função dos estudos preliminares e produção da metodologia de trabalho, que direcionaram as análises das variáveis mais relacionadas com o processo fermentativo. Portanto foram propostos dois planejamentos experimentais para estudar o quão são significativos no processo fermentativo os fatores como composição do meio fermentativo e diferença entre genótipos e levedura em função do tempo de fermentação.

5.4.1 Análise do Planejamento Fatorial 2²

Os ensaios apresentados na tabela 8 foram realizados com o genótipo de batata-doce UGA 05, com os tempos de fermentação de 72 e 96 horas sob a variação da inserção ou não de nutrientes.

Tabela 8. Ensaios realizados do planejamento 2² com dados experimentais, média dos resultados, grau de liberdade e variância.

Ensaio	1 Tempo	2 Meio	Resposta / °GL		n° g. l.	Média	s _i ²
1	72 h	sem nutrientes	14,96	14,71	1	14,835	0,0313
2	96 h	sem nutrientes	9,43	11,79	1	10,310	1,5488
3	72 h	com nutrientes	14,20	12,70	1	13,450	1,1250
4	96 h	com nutrientes	8,05	8,17	1	8,110	7,2.10 ⁻³

Considerando cada coluna dos efeitos (1 e 2), cujos coeficientes codificados formam uma matriz vertical de uma coluna por quatro linhas. A coluna das médias dos resultados é considerada como uma segunda matriz. Cada efeito foi calculado como sendo o determinante

resultante da matriz transposta da coluna codificada do efeito multiplicada pela matriz que contém os resultados obtidos pela média dos ensaios.

Para o cálculo do erro padrão foi utilizando primeiramente encontrando o valor para a variância conjunta, S^2_{conj} expressa a seguir:

Onde:

S^2_{conj} = Variância conjunta;

V_i = Grau de liberdade do ensaio;

S^2_i = Variância do ensaio.

$$S^2_{conj} = \frac{\sum V_i \cdot S^2_i}{\sum V_i}$$

$$S^2_{conj} = \frac{(1.0,03125) + (1.1,5488) + (1.1,125) + (1.7,2 \cdot 10^{-3})}{1+1+1+1}$$

$$S^2_{conj} = 0,5795$$

A variância conjunta foi usada no cálculo da variância do efeito e posteriormente ao realizar a operação da raiz quadrada da variância obteve-se o valor do desvio padrão do efeito.

Onde:

S^2_{efeito} = Variância do efeito;

S^2_{conj} = Variância conjunta;

k = número de variáveis envolvidas no planejamento;

S = Desvio padrão do efeito.

$$S^2_{efeito} = \sum_{i=1}^{2^k} \frac{S^2_{conj}}{(2^{k-1})^2 \cdot (n^\circ \text{repetições})}$$

$$S^2_{efeito} = \frac{S^2_{conj}}{(n^\circ \text{repetições})} \sum_1^{2^2} \left(\frac{1}{(2^{2-1})^2} \right)_i$$

$$S^2_{efeito} = \frac{0,678}{2} \cdot \left(\frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4} \right)$$

$$S^2_{efeito} = \frac{0,678}{2} \cdot \frac{4}{4}$$

$$S^2_{efeito} = 0,339$$

$$S_{efeito} = 0,582$$

Como os ensaios são realizados em duplicata, o valor do desvio padrão da média é o valor do desvio padrão do efeito dividido por dois.

Os resultados apresentados na tabela 8 foram tratados, o cálculo dos efeitos e o erro padrão estão apresentados na tabela 9, e avaliação de efeitos estatisticamente significativos.

Tabela 9. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2² e os erros padrões.

Média	11,68 ± 0,29
Efeitos Principais:	
1 (tempos de fermentação)	-4,93 ± 0,58 *
2 (meio fermentativo)	-1,79 ± 0,58 *
Interação de dois fatores	
12 (tempo/meio)	-0,40 ± 0,58
* Significativos com $\alpha > 0,05$ para os valores maiores que 1,61.	

Para o teste de averiguação da significância dos efeitos, o valor do desvio padrão deve ser multiplicado pelo valor de t de Student tabelado. Para o planejamento fatorial 2², quatro ensaios são considerados, portanto o valor de t tabelado a 95% de confiança é de 2,776 e multiplicado pelo desvio padrão obtido de 0,58, resulta em 1,61. Portanto os efeitos são significativos quando acima de 1,61 a 95% de confiança.

Desta forma, os resultados apresentados na tabela 8 denotam que ambos os efeitos, **1** tempo de fermentação e **2** meio fermentativo, com -4,93 e -1,79, respectivamente, são maiores que 0,94 e portanto significativos em 95% de confiança. Sendo que o fator **1**, tempo, possui efeito mais expressivo em relação ao efeito **2**, meio.

É possível observar que os valores obtidos para o cálculo dos efeitos gerou resultados de módulo negativos, sugerindo que a qualidade de etanol, em °GL, tenha sido alterada quando o ensaio variou do nível de coeficientes (-) para o nível acima (+), ou seja, os melhores resultados tendem aos ensaios de 72 horas e sem nutrientes.

Este resultado pode ser observado pelo gráfico normal, onde os efeitos 1 tempo e 2 meio, representados pelas letras A e B, respectivamente. Ambos os efeitos encontram-se fora da reta normal, como mostra a figura 13.

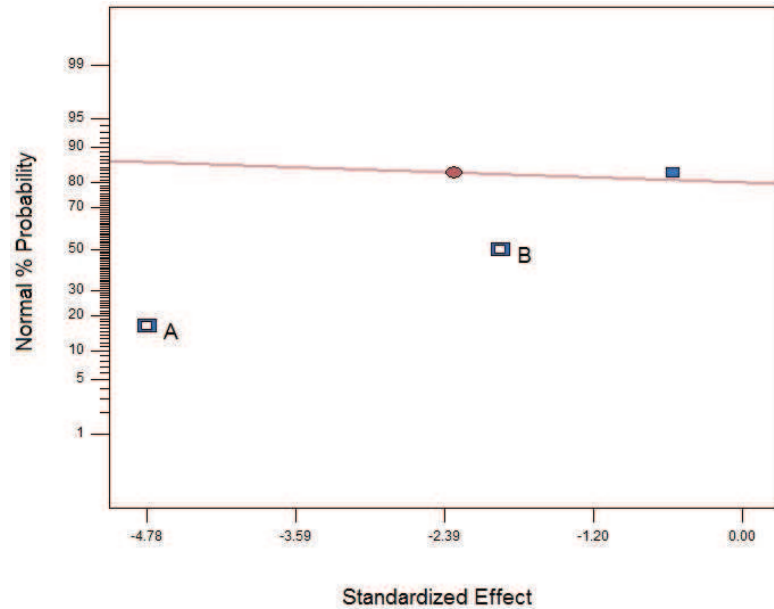


Figura 13. Gráfico normal para os efeitos principais, para o planejamento 2^2 .

Na figura 13 a confirmação dos resultados indicados na Tabela 9. A reta normal que considera os ensaios realizados (Figura 14) os efeitos 1-tempo e 2-meio, representados pelos símbolos A e B, respectivamente, encontram-se fora da reta normal, fato que caracteriza que os efeitos são significativos no processo fermentativo.

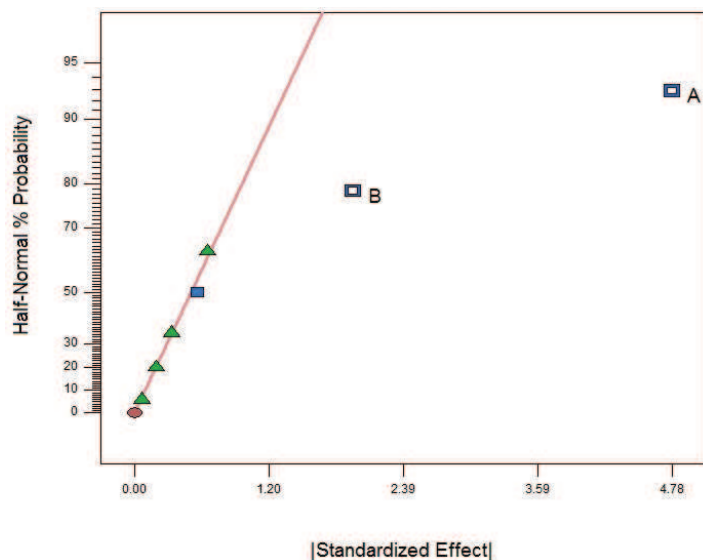


Figura 14. Gráfico normal considerando a média dos ensaios, para o planejamento 2^2 .

Além dos efeitos principais apresentarem comportamento significativo, a interação formada entre eles não se comportou significativamente. Este comportamento pode ser confirmado pelo gráfico de interação entre o teor alcóolico em função do tempo de fermentação apresentando os valores obtidos variando-se o meio em função da adição ou não de nutrientes.

A interação **12** (tempo/meio) não é considerada significativa, como indicou a tabela 8, este comportamento é observado pelo gráfico de interação entre os efeitos investigados, como apresenta a figura 15.

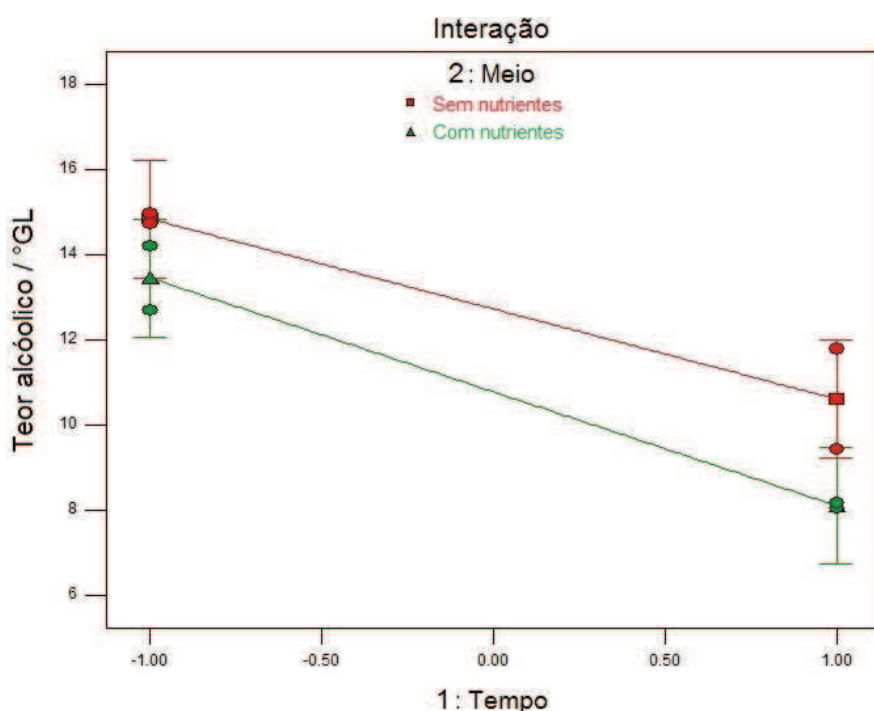


Figura 15. Interação entre os efeitos **12**, tempo/meio, do planejamento 2^2 .

Nota-se no gráfico que os efeitos estão quase paralelos entre si, indicando que a interação entre eles não apresenta efeito significativo.

Sendo assim, a regressão proposta apresenta o °GL como uma função de y , relacionando x_1 e x_2 , como sendo as variáveis referentes aos efeitos **1** e **2**, respectivamente.

O modelo estatístico gerado pelo programa Design Expert para os resultados obtidos está apresentado na equação 6.

$$y = 11,75 - 2,39 \cdot x_1 - 0,97 \cdot x_2 \quad \text{Equação 6}$$

A partir do modelo de regressão proposto, foram realizados alguns cálculos para determinar se o modelo proposto é válido para responder o comportamento dos resultados observados.

Estes cálculos foram empregados para a construção da tabela ANOVA. O software disponibiliza os valores das Somas Quadráticas, número de grau de liberdade e médias quadráticas, para as fontes de variação relacionadas à regressão, resíduos, falta de ajuste e erro puro.

Cálculo do número de grau de liberdade para a análise de variância proposta para o planejamento fatorial 2^2 .

Onde:

n = número de repetições;

p = parâmetro da regressão;

m = número de níveis da variável.

Grau de liberdade total:

$$Total = n - 1$$

$$Total = n - 1 = 8 - 1 = 7$$

Grau de liberdade da Regressão

$$Regressão = p - 1$$

$$Regressão = p - 1 = 3 - 1 = 2$$

Grau de liberdade dos Resíduos:

$$Resíduos = n - p$$

$$Resíduos = n - p = 8 - 3 = 5$$

Grau de liberdade do Erro Puro:

$$ep = \sum (n_i - 1) = (n - m)$$

$$ep = n - m = 8 - 4 = 4$$

Grau de liberdade da Falta de Ajuste:

$$faj = m - p$$

$$faj = m - p = 4 - 3 = 1$$

Os valores dos graus de liberdade são usados na razão entre soma quadrática e grau de liberdade para a obtenção do valor das médias quadráticas das fontes de variação, apresentados na tabela ANOVA.

Outro cálculo realizado para avaliar a aptidão do modelo de regressão é por meio da obtenção da porcentagem explicada e porcentagem máxima explicável.

Porcentagem explicada:

$$\% = \frac{SQ_R}{SQ_T}$$

Onde,

SQ_R = Soma Quadrática da Regressão;

SQ_T = Soma Quadrática Total.

$$\% = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{53,29}{57,86} \cdot 100 = 92,10\%$$

Porcentagem máxima explicável:

$$\% = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$$

Onde,

SQ_T = Soma Quadrática Total;

SQ_{ep} = Soma Quadrática do Erro Puro.

$$\% = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{57,86 - 3,95}{57,86} \cdot 100 = 93,17\%$$

Agrupando os resultados obtidos das equações em uma tabela ANOVA, obtêm-se a análise da variância para a regressão proposta (Tabela 10).

Tabela 10. Tabela ANOVA para o planejamento fatorial 2².

Fonte de variação	Soma Quadrática	N° de g. l.	Média Quadrática
Regressão	53,29	2	26,65
Resíduos	4,57	5	0,91
Falta de Ajuste	0,62	1	0,62
Erro puro	3,95	4	0,99
Total	57,86	7	
% da variação explicada: 92,10			
% máxima de variação explicável: 93,17			

Admitindo que os erros sigam uma distribuição normal, o calculou-se a razão entre as médias quadráticas da regressão pelo resíduo, ou seja, o teste F para a regressão:

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r}$$

Onde,

MQ_R = Média Quadrática da Regressão;

MQ_r = Média Quadrática do resíduo.

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r} = \frac{26,65}{0,91} = 29,29$$

A razão, MQ_R/MQ_r , é de 29,29. O grau de liberdade calculado para a regressão e o resíduo foi de 2 e 5, respectivamente. O valor tabelado no nível de 95% de confiança é de $F_{2,5} = 5,79$. Como o valor de F da regressão calculado é superior ao valor tabelado o modelo de regressão proposto é significativo.

Agora se torna necessário encontrar se há evidências de falta de ajuste no modelo, por meio de outro teste F para falta de ajuste:

$$F = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$$

Onde,

MQ_{faj} = Média Quadrática da Falta de Ajuste;

MQ_{ep} = Média Quadrática do Erro Puro.

$$F = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = \frac{0,62}{0,99} = 0,626$$

A razão entre MQ_{faj}/MQ_{ep} , cujo valor obtido de 0,626 é inferior ao valor tabelado. Tendo em vista que o grau de liberdade encontrado para a falta de ajuste e para o erro puro, são respectivamente 1 e 4, o valor encontrado tabelado de $F_{1,4} = 7,71$, é superior ao encontrado, indicando que a regressão é significativa e que não apresenta falta de ajuste. Portanto os resultados da análise de variância sugerem que o modelo estatístico é válido para um intervalo de 95% de confiança.

A verificação do modelo estatístico, por meio da análise de resíduos gerados pela falta de ajuste está apresentada na figura 16.

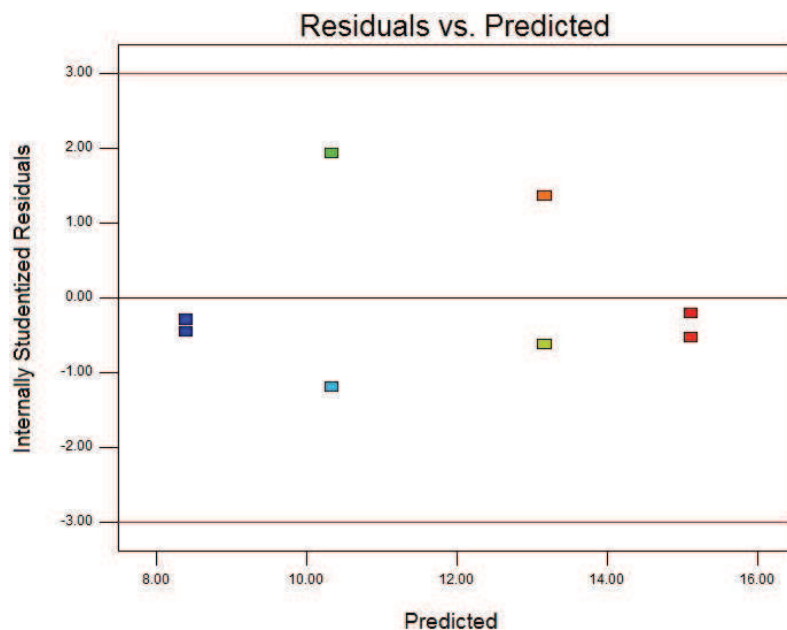


Figura 16. Resíduos gerados pela falta de ajuste para o planejamento fatorial 2^2 .

Os resíduos se comportam de forma aleatória, indicando que não há evidência de falta de ajuste do modelo estatístico proposto para o planejamento fatorial 2^2 .

A mesma análise de resíduos estende-se para os resíduos gerados em função dos erros experimentais, ou seja, em relação ao erro puro (Figura 17).

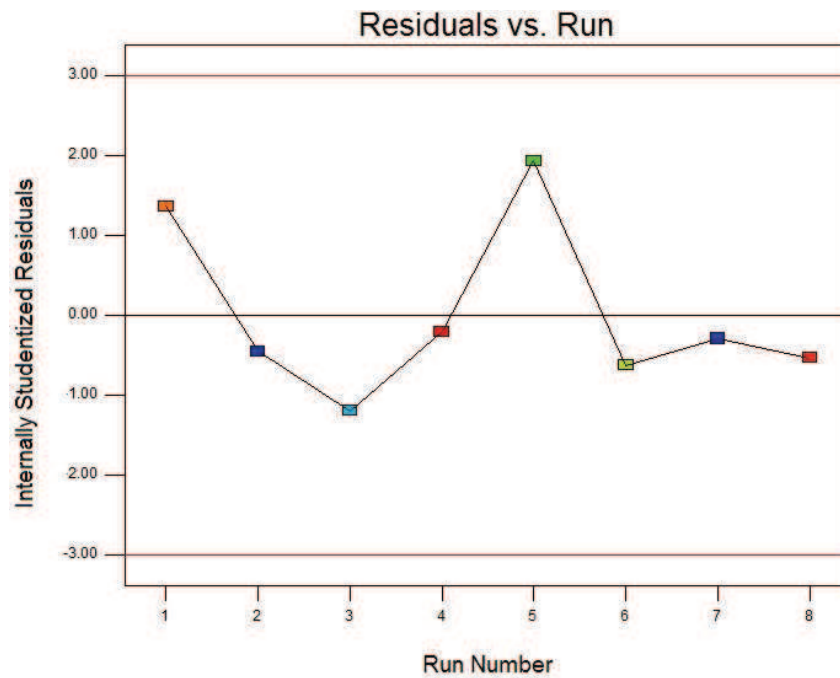


Figura 17. Gráfico de resíduos gerados pelo erro puro para o planejamento fatorial 2^2 .

O comportamento encontrado no gráfico de resíduos para o erro puro também não são significativos, pois se comportam de forma aleatória em torno da média.

Portanto, está confirmado que o modelo de regressão proposto é válido para representar os resultados obtidos para o fatorial 2^2 .

Considerando o modelo de regressão, a avaliação dos ensaios realizados torna-se importante para a determinação dos melhores ensaios. Desta forma é possível verificar em que condições experimentais o melhor ensaio ocorreu. Sendo assim a Figura 18, apresenta um gráfico do fator 1, tempo em função do fator 2, meio, contendo nos vértices de um quadrado o valor respectivo da média do ensaio realizado.

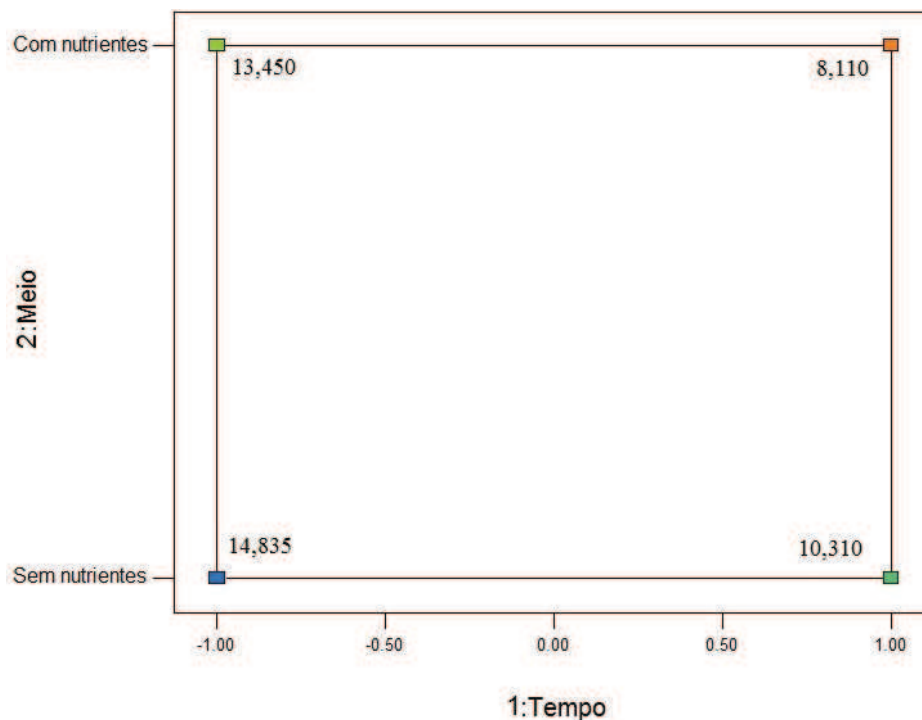


Figura 18. Combinação entre fatores e os níveis de variação em função dos resultados do planejamento experimental 2^2 .

O melhor resultado, de 14,83 °GL, foi obtido a partir do ensaio com tempo de fermentação de 72 horas e sem a inserção de nutrientes, como a figura 18 apresenta o resumo de ensaios.

A análise dos resultados mostra que a inserção de nutrientes não contribui para uma melhora na produção de etanol. Outro fator decisivo na avaliação do processo foi percebido experimentalmente, pois as destilações das amostras que continham nutrientes provavelmente tenham conferido ao mosto um efeito ebulioscópico na destilação das amostras fermentadas, visto que a inserção dos compostos inorgânicos no mosto alterou consideravelmente a temperatura de ebulição do etanol produzido, tornando-a instável e acima do ponto de ebulição padrão do álcool etílico. Desta forma, estas considerações foram empregadas para o estudo do planejamento de três fatores.

5.4.2 Análise do Planejamento Fatorial 2^3

O estudo das variáveis do processo fermentativo do planejamento fatorial 2^2 indicou que a inserção de nutrientes não contribuiu significativamente para a produção de álcool. Por este motivo, no planejamento fatorial 2^3 , a manteve-se a variável, **1**, tempo de fermentação e

alterou-se a variável **2**, para a variação entre genótipos, UGA 05 e UGA77. A terceira variável, **3**, inserida neste delineamento estatístico foi o tipo de levedura empregada para fermentar o mosto de batata-doce, em tablete ou pó. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Ensaios realizados do planejamento 2³ com dados experimentais, média dos resultados, grau de liberdade e variância.

Ensaio	1 Tempo	2 Genótipo	3 Levedura	Resposta / °GL		n° g. l.	média	s _i ²
1	72 h	UGA 05	Pó	6,03	7,67	1	6,85	1,345
2	96 h	UGA 05	Pó	15,08	17,60	1	16,34	1,782
3	72 h	UGA 77	Pó	21,24	19,36	1	20,30	1,767
4	96 h	UGA 77	Pó	19,61	17,72	1	18,67	1,786
5	72 h	UGA 05	Tablete	18,60	17,10	1	17,85	1,125
6	96 h	UGA 05	Tablete	19,48	17,72	1	18,60	1,549
7	72 h	UGA 77	Tablete	33,31	31,43	1	32,37	1,767
8	96 h	UGA 77	Tablete	23,21	21,50	1	22,505	2,020

O cálculo dos efeitos se dá pela matriz transposta da coluna codificada do efeito multiplicada pela matriz que contém os resultados obtidos pela média dos ensaios.

Para o cálculo do erro padrão foi utilizando primeiramente encontrando o valor para a variância conjunta, S²_{conj} expressa a seguir:

Onde:

S²_{conj} = Variância conjunta;

V_i = Grau de liberdade do ensaio;

S²_i = Variância do ensaio.

$$S_{conj}^2 = \frac{\sum v_i \cdot s_i^2}{\sum v_i}$$

$$S_{conj}^2 = \frac{(1.1,125) + (1.1,1549) + (1.1,767) + (1.2.020) + (1.1,345) + (1.1,782) + (1.1,767) + (1.1,186)}{1+1+1+1+1+1+1+1}$$

$$S_{conj}^2 = 1,643$$

A variância conjunta foi usada no cálculo da variância do efeito e posteriormente ao realizar a operação da raiz quadrada da variância obtêm-se o valor do desvio padrão do efeito.

$$S_{efeito}^2 = \sum_{i=1}^{2^k} \frac{S_{conj}^2}{(2^{k-1})^2 \cdot (n^\circ \text{repetições})}$$

$$S_{efeito}^2 = \frac{S_{conj}^2}{(n^\circ \text{repetições})} \sum_1^{2^3} \left(\frac{1}{(2^{3-1})^2} \right)_i$$

$$S_{efeito}^2 = \frac{1,643}{2} \cdot \left(\frac{1}{16} + \frac{1}{16} + \frac{1}{16} + \frac{1}{16} + \frac{1}{16} + \frac{1}{16} + \frac{1}{16} + \frac{1}{16} \right)$$

$$S_{efeito}^2 = \frac{1,643}{2} \cdot \frac{8}{16}$$

$$S_{efeito}^2 = 0,411$$

$$S_{efeito} = 0,641$$

Como os ensaios são realizados em duplicata, o valor do desvio padrão da média é o valor do desvio padrão do efeito dividido por dois.

Os resultados apresentados na tabela 10 foram tratados, o cálculo dos efeitos e o erro padrão estão apresentados na tabela 12, e avaliação de efeitos estatisticamente significativos.

Tabela 12. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 e os erros padrões.

Media	19,18 ± 0,33
Efeitos Principais:	
1 (tempos de fermentação)	-0,63 ± 0,64
2 (genótipo)	17,10 ± 0,64 *
3 (levedura)	14,59 ± 0,64 *
Interação de dois fatores:	
12 (tempo/genótipo)	-10,87 ± 0,64 *
13 (tempo/levedura)	-8,49 ± 0,64 *
23 (genótipo/levedura)	1,33 ± 0,64
Interação de três fatores:	
123 (tempo/genótipo/levedura)	0,26 ± 0,64

* Significativos com $\alpha > 0,05$ para os valores maiores que 1,48.

Para o teste de averiguação da significância dos efeitos, o valor do desvio padrão deve ser multiplicado pelo valor de t de Student tabelado. Para o planejamento fatorial 2^3 , oito ensaios são considerados, portanto o valor de t tabelado a 95% de confiança é de 2,306 e multiplicado pelo desvio padrão obtido de 0,64, resulta em 1,48. Portanto os efeitos são significativos quando acima de 1,48 a 95% de confiança.

Desta forma, os resultados para o planejamento fatorial 2^3 , entretanto mostram que somente a diferença entre genótipos, efeito **2**, e o tipo de levedura, efeito **3**, empregada no processo são significativos, com valores de 17,10 e 14,59, respectivamente, sendo estes acima do erro de 1,48 para o intervalo de 95% de confiança.

Os valores obtidos no cálculo dos efeitos são de módulo positivo e nos infere que o álcool obtido, em °GL, tenha sido melhor quando o ensaio variou dos coeficientes (-) ao (+). Sugerindo que o ensaio para os efeitos **2** e **3**, respectivamente, genótipo UGA 77 e a levedura tablete tendam aos melhores resultados.

As interações significativas são a tempo/genótipo, do tipo **12** e tempo/levedura, do tipo **13**, com valores de -10,87 e -8,49, respectivamente a 95% de confiança. O efeito genótipo/levedura, **23**, e tempo/genótipo/levedura, **123**, não são estatisticamente significativos, visto que o valor dos efeitos calculados são inferiores que 1,48.

O comportamento dos fatores, bem como as interações significativas são confirmadas no gráfico normal (Figura 19), onde encontram-se fora da reta os efeitos significativos.

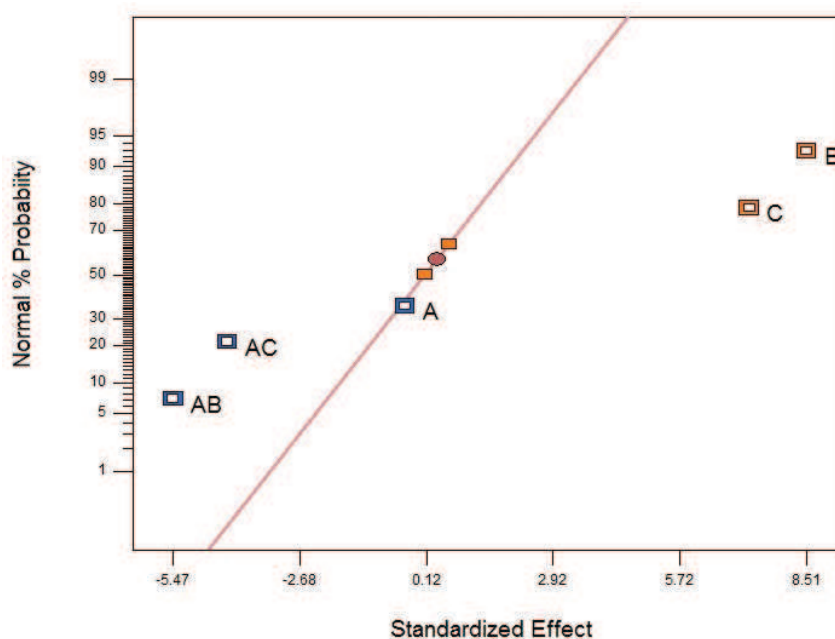


Figura 19. Gráfico normal para os efeitos principais, para o planejamento 2^3 .

Como esperado, observa-se na figura 19, que efeitos **1** e **2** representados pelos símbolos A e B, respectivamente ficam fora da reta normal e são significativos. As interações **12** tempo/genótipo e **13** tempo/levedura apresentam comportamento significativo e são representadas pelo símbolo AB e AC, respectivamente.

A reta normal que considera os ensaios realizados (Figura 20) confirma que são significativos **1**, **2**, **12** e **13**, representados por A, B, AB e AC, respectivamente.

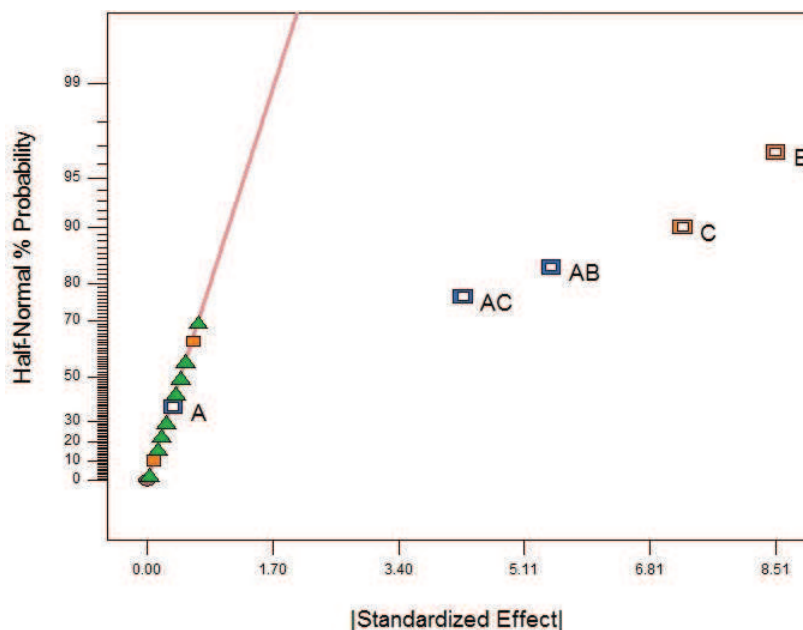


Figura 20. Gráfico normal considerando a média dos ensaios, para o planejamento 2^3 .

Para o modelo estatístico, o efeito **1**, tempo de fermentação, não seja significativo no fatorial 2^3 , mas as interações formadas por ele são significativas, por este motivo o efeito **1** foi acondicionado como significativo para que se possa ter melhor avaliação do efeito de interações **12** e **13**, respectivamente entre tempo/genótipo e tempo/levedura.

As interações formadas apresentaram comportamento significativo. Primeiramente a análise de interação do tipo **12**, tempo/genótipo pelo gráfico de interação entre o teor alcoólico em função do tempo de fermentação apresentando os valores obtidos variando-se o ensaio para a fermentação do genótipo UGA 05 e UGA 77.

A análise de interação existente entre a atuação dos genótipos de batata-doce em função do tempo está apresentada na figura 21.

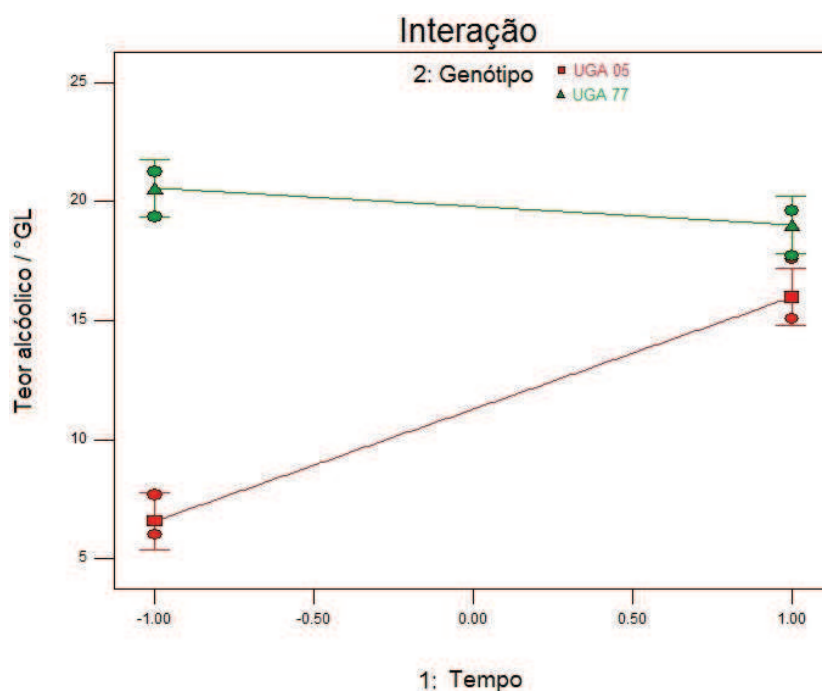


Figura 21. Interação entre os efeitos 12, tempo/genótipo, do planejamento 2³.

O gráfico de interação da figura 21 mostra que as retas não estão paralelas entre si, de forma que tendem a se encontrar, fato que caracteriza a interação significativa.

Observa-se que há um acréscimo dos valores de teor alcóolico quando o tempo variou do ensaio de 72 horas de fermentação para o de 96 horas para o clone de batata-doce UGA 05.

Portanto o efeito que o tempo produz é mais expressivo para o genótipo UGA 05, onde o tempo tende a aumentar a produção de etanol deste clone de batata-doce.

A outra interação significativa no processo fermentativo é a ação da levedura em função do tempo de fermentação, interação do tipo 13, tempo/levedura. A Figura 22 apresenta o gráfico de interação fixando o tempo de fermentação em função do tempo de fermentação sob a variação da levedura em pó e em tablete.

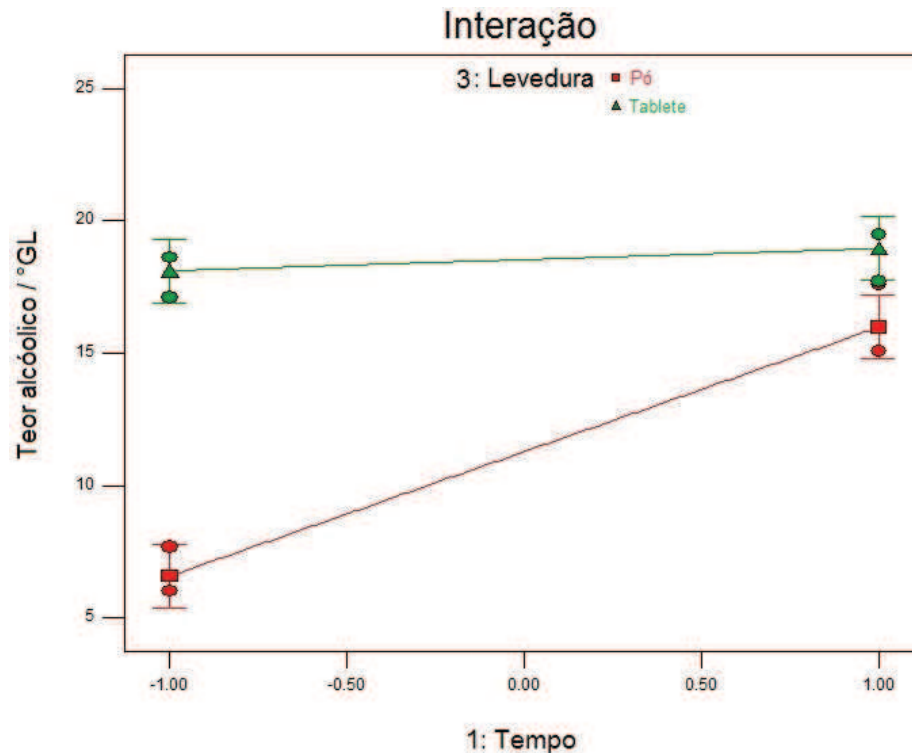


Figura 22. Interação entre os efeitos 13, tempo/levedura, do planejamento 2^3 .

O gráfico de interação da Figura 22 demonstra que os efeitos não são paralelos entre si, caracterizando a interação significativa.

A relação existente entre o tempo e a ação das leveduras, mostra um comportamento mais expressivo na levedura em pó, visto que foi observado um aumento no teor alcóolico quando o ensaio variou de 72 para 96 horas de fermentação sob a ação da levedura em pó.

Para um melhor entendimento entre as interações existentes, o modelo estatístico gerado pelo programa Design Expert® criou equações para caracterizar o efeito das interações.

Fixando o comportamento do genótipo de batata-doce UGA 05 sob a influência da ação das leveduras em função do tempo, o programa gerou modelos estatísticos.

A equação 7 apresenta o comportamento da fermentação da cultivar UGA 05 fermentada com a levedura em pó.

$$\begin{array}{c}
 \text{UGA05} \\
 \text{Pó} \\
 y = 11,28250 + 4,7 \cdot \text{Tempo} \qquad \text{Equação 7}
 \end{array}$$

O comportamento encontrado no gráfico de interação é confirmado, visto que o coeficiente da variável tempo possui módulo positivo, o que sugere que a produção de etanol venha a aumentar com o passar do tempo quando a batata-doce UGA 05 é fermentada com levedura em pó.

Quando a fermentação do mesmo clone ocorre sob a ação da levedura em tablete, o coeficiente da variável tempo também possui módulo positivo, porém com um valor menor (Equação 8), indicando que o efeito do tempo é menos expressivo quando a fermentação ocorre com este tipo de fermento.

$$\begin{array}{c} \text{UGA05} \\ \text{Tablete} \end{array} \quad y = 18,53750 + 0,42 \cdot \text{Tempo} \quad \text{Equação 8}$$

O mesmo procedimento foi aplicado para a avaliação do comportamento do genótipo UGA 77 em função da levedura, a equação proposta pelo programa para a fermentação do genótipo 77 fermentado sob a ação da levedura em pó está apresentada na equação 9.

$$\begin{array}{c} \text{UGA77} \\ \text{Pó} \end{array} \quad y = 19,79500 - 0,77250 \cdot \text{Tempo} \quad \text{Equação 9}$$

Nota-se na equação 9 que o coeficiente da variável tempo possui módulo negativo, sugerindo que o tempo não contribua para um aumento na produção de álcool. O genótipo UGA 77 quando fermentado sob a ação da levedura em pó, não apresenta aumento na produção de álcool em função do tempo de fermentação.

Quando a levedura em tablete é usada para fermentar o genótipo UGA 77 o efeito do tempo é mais expressivo, visto que o coeficiente agregado a variável tempo é maior, e também em módulo negativo, como mostra a equação 10.

$$\begin{array}{c} \text{UGA77} \\ \text{Tablete} \end{array} \quad y = 27,05000 - 5,05250 \cdot \text{Tempo} \quad \text{Equação 10}$$

No genótipo UGA 77 o tempo apresentou efeito contrário ao observado no clone UGA 05, apresentando diminuição da produtividade de álcool quando a batata-doce UGA 77 é fermentada, comportamento mais expressivo quando empregou-se a levedura em tablete.

Portanto, a influência do tempo de fermentação pode variar dependendo do tipo de genótipo e de levedura empregado no processo fermentativo. O tempo apresentou maior influência na batata-doce UGA 05, sugerindo que esta cultivar venha a produzir mais álcool com o passar do tempo quando fermentada sob a ação da levedura em pó.

Para explicar o comportamento dos resultados obtidos o modelo estatístico proposto pelo programa Design Expert para os resultados obtidos está apresentado na equação 11.

$$y = 19,17 - 0,18 \cdot x_1 + 4,26 \cdot x_2 + 3,63 \cdot x_3 - 2,74 \cdot x_1x_2 - 2,14 \cdot x_1x_3 \quad \text{Equação 11}$$

O modelo de regressão proposto pelo programa Design Expert apresenta os parâmetros criados e codificados com os símbolos, sendo que x_1 refere-se ao efeito **1**, assim como o x_2 ao efeito **2**, o x_3 ao efeito **3**, x_1x_2 ao efeito **12** e x_1x_3 ao efeito **13**. O estudo do melhor modelo que represente os resultados foi obtido adicionando o efeito **1**, visto pelo parâmetro x_1 , mesmo que não seja significativo, porém a inserção desse parâmetro foi para melhor estudar os efeitos de interação, e o mesmo apresenta baixo valor para o coeficiente do parâmetro x_1 .

A partir do modelo de regressão proposto, foram realizados alguns cálculos para determinar se o modelo proposto é válido para responder o comportamento dos resultados observados.

Os cálculos realizados foram utilizados na construção da tabela ANOVA. O software disponibiliza os valores das Somas Quadráticas, número de grau de liberdade e médias quadráticas, para as fontes de variação relacionadas à regressão, resíduos, falta de ajuste e erro puro.

Cálculo do número de grau de liberdade para a análise de variância proposta para o planejamento fatorial 2^3 .

Onde:

n = número de repetições;

p = parâmetro da regressão;

m = número de níveis da variável.

Grau de liberdade total:

$$Total = n - 1$$

$$Total = n - 1 = 16 - 1 = 15$$

Grau de liberdade da Regressão

$$Regressão = p - 1$$

$$Regressão = p - 1 = 6 - 1 = 5$$

Grau de liberdade dos Resíduos:

$$Resíduos = n - p$$

$$Resíduos = n - p = 16 - 6 = 10$$

Grau de liberdade do Erro Puro:

$$ep = \sum (n_i - 1) = (n - m)$$

$$ep = n - m = 16 - 8 = 8$$

Grau de liberdade da Falta de Ajuste:

$$faj = m - p$$

$$faj = m - p = 8 - 6 = 2$$

Os valores dos graus de liberdade foram usados na razão entre soma quadrática e grau de liberdade para a obtenção do valor das médias quadráticas das fontes de variação, apresentados na tabela ANOVA.

Outro cálculo realizado para avaliar a aptidão do modelo de regressão é por meio da obtenção da porcentagem explicada e porcentagem máxima explicável.

Porcentagem explicada:

$$\% = \frac{SQ_R}{SQ_T}$$

Onde,

SQ_R = Soma Quadrática da Regressão;

SQ_T = Soma Quadrática Total.

$$\% = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{693,95}{709,53} \cdot 100 = 97,80$$

Porcentagem máxima explicável:

$$\% = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$$

Onde,

SQ_T = Soma Quadrática Total;

SQ_{ep} = Soma Quadrática do Erro Puro.

$$\% = \frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T} = \frac{709,53 - 13,98}{709,53} \cdot 100 = 98,03\%$$

Agrupando os resultados obtidos das equações em uma tabela ANOVA, obtêm-se a análise da variância para a regressão proposta para o planejamento fatorial 2^3 (Tabela 13).

Tabela 13. Tabela ANOVA para o planejamento fatorial 2^3 .

Fonte de variação	Soma Quadrática	N° de g. l.	Média Quadrática
Regressão	693,95	5	138,79
Resíduos	15,57	10	1,56
Falta de Ajuste	1,59	2	0,80
Erro puro	13,98	8	1,75
Total	709,53	15	
% da variação explicada: 97,80			
% máxima de variação explicável: 98,03			

Admitindo que os erros sigam uma distribuição normal, o calculou-se a razão entre as médias quadráticas da regressão pelo resíduo, ou seja, o teste F para a regressão:

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r}$$

Onde,

MQ_R = Média Quadrática da Regressão;

MQ_r = Média Quadrática do resíduo.

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r} = \frac{138,79}{1,56} = 88,97$$

A razão, MQ_R/MQ_r , encontrada é de 88,97. O grau de liberdade calculado para a regressão e o resíduo foi de 5 e 10, respectivamente. O valor tabelado no nível de 95% de confiança é de $F_{5,10} = 3,33$. Como o valor de F da regressão calculado é superior ao valor tabelado o modelo de regressão proposto é significativo

Agora se torna necessário encontrar se há evidências de falta de ajuste no modelo, por meio de outro teste F para falta de ajuste:

$$F = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$$

Onde,

MQ_{faj} = Média Quadrática da Falta de Ajuste;

MQ_{ep} = Média Quadrática do Erro Puro.

$$F = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = \frac{0,88}{1,75} = 0,460$$

A razão entre MQ_{faj}/MQ_{ep} , cujo valor obtido de 0,460 é inferior ao valor tabelado. Tendo em vista que o grau de liberdade encontrado para a falta de ajuste e para o erro puro, são respectivamente 2 e 8, o valor encontrado tabelado de $F_{2,8} = 4,46$, é superior ao encontrado, indicando que a regressão é significativa e que não apresenta falta de ajuste. Portanto os resultados da análise de variância sugerem que o modelo estatístico é válido para um intervalo de 95% de confiança.

A análise dos resíduos gerados pela falta de ajuste do modelo proposto para o planejamento experimental 2^3 está apresentada na figura 23.

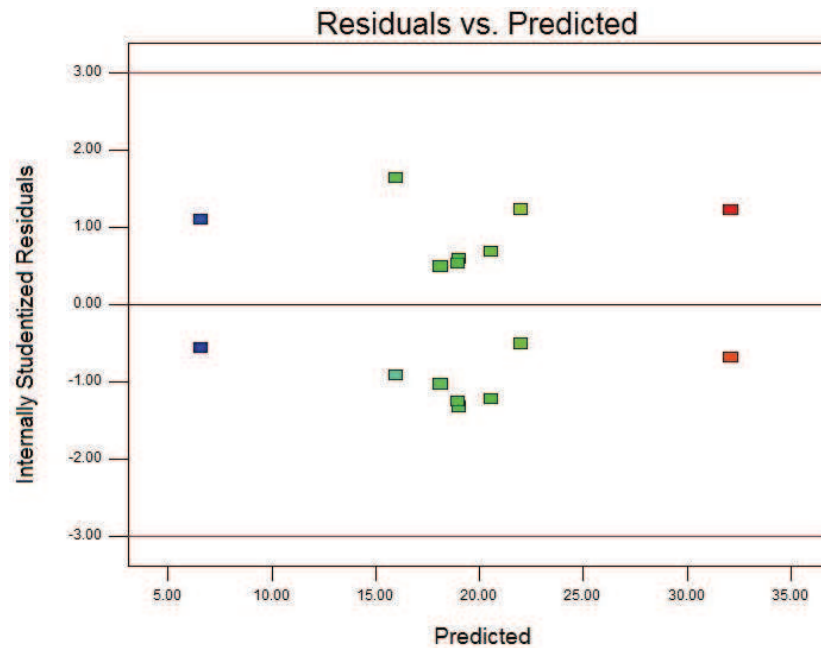


Figura 23. Resíduos gerados pela falta de ajuste para o planejamento fatorial 2^3 .

Como o comportamento dos resíduos gerados pela falta de ajuste são aleatórios demonstra que o modelo está apto a explicar os resultados do planejamento. Os resíduos gerados pelo erro experimental, representados pelo erro puro estão apresentados na figura 24.

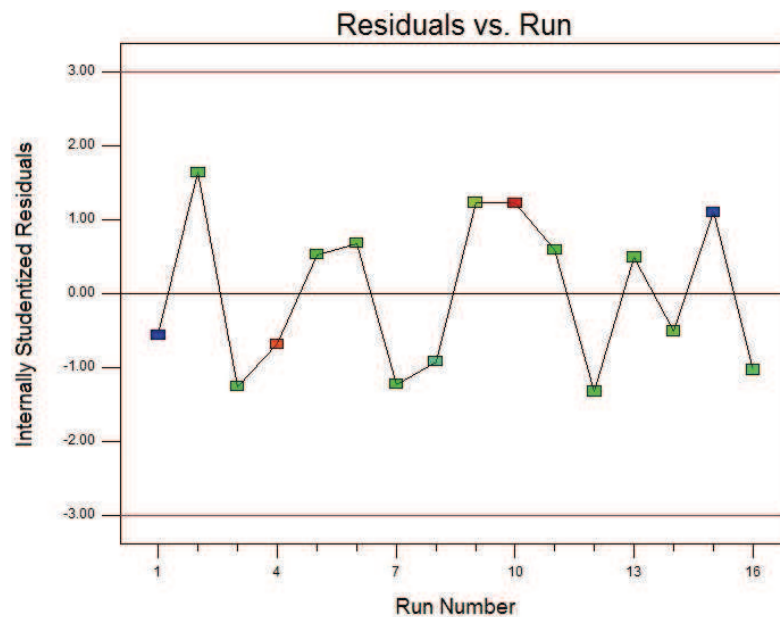


Figura 24. Resíduos gerados pelo erro puro para o planejamento fatorial 2^3 .

Nos gráficos de resíduo apresentados, tanto pela falta de ajuste quanto ao erro puro, o comportamento residual foi aleatório em torno da média, indicando que não há evidência de falta de ajuste do modelo, logo o modelo estatístico proposto é significativo.

Portanto, está confirmado que o modelo de regressão proposto é válido para representar o comportamento dos resultados obtidos para o fatorial 2^3 .

Considerando o modelo de regressão, a avaliação dos ensaios realizados torna-se importante para a determinação dos melhores ensaios. Desta forma é possível verificar em que condições experimentais o melhor ensaio ocorreu. Desta forma, os resultados obtidos experimentalmente foram arranjados na forma de um cubo, cujos vértices referem-se aos ensaios codificados das três variáveis, a figura 25 apresenta o resumo de ensaios.

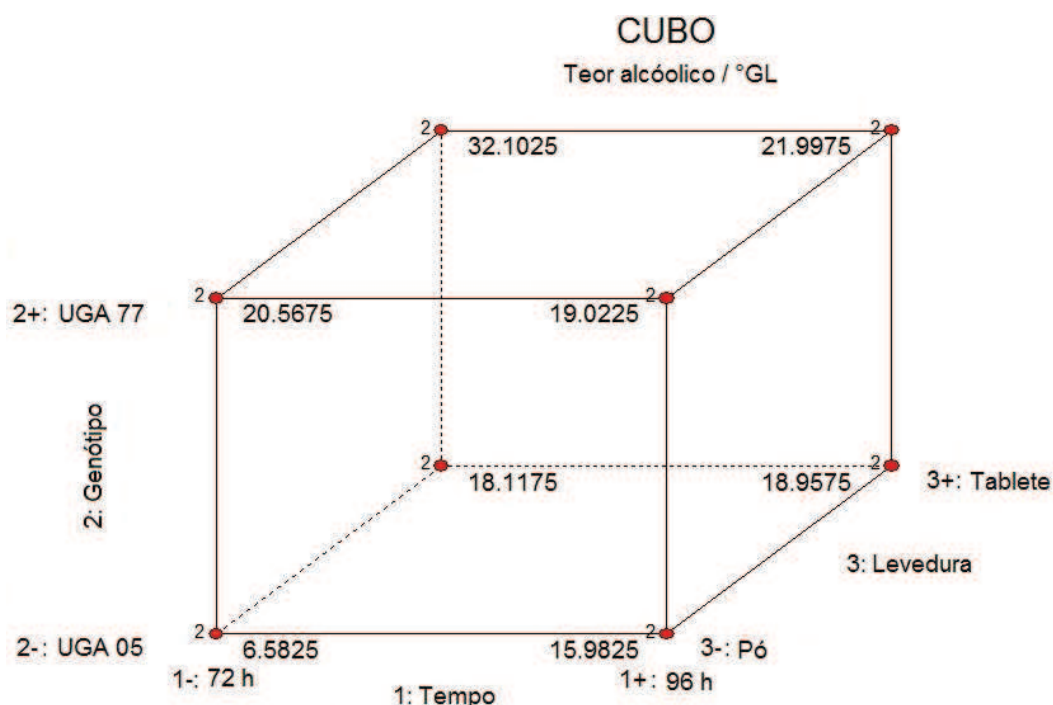


Figura 25. Análise do melhor ensaio pelo método do cubo.

A análise dos vértices do cubo indica que o ensaio que gerou a maior média de etanol em °GL, apresenta um valor de 32,1025. Este resultado foi obtido a partir da realização do ensaio sob as seguintes condições: efeito 1 contraste (-), efeito 2 contraste (+), efeito 3 contraste (+), ou seja, no tempo de 72 horas de fermentação da batata-doce UGA 77 com emprego da levedura em tablete.

Para uma melhor avaliação do processo fermentativo e um aprimoramento de resultados seria necessário um estudo em função da superfície de resposta, pois desta forma é possível encontrar o ponto máximo para a melhor produção de etanol. Porém não foi possível

obter o gráfico de superfície de resposta deste planejamento fatorial porque das três variáveis estudadas, apenas uma é numérica, tempo de fermentação, e as outras duas variáveis são categóricas, desta forma, não é possível prolongar os resultados e gerar a superfície de resposta.

6 CONCLUSÕES

Os genótipos de batata-doce apresentam diferenças significativas entre si e interagem com o tempo de formas diferentes. O tempo aumenta a aptidão do genótipo UGA 05.

O clone de batata-doce UGA 05 fermentado com a levedura em pó apresentou melhores condições no tempo de 72 horas. Os melhores resultados foram obtidos com o genótipo UGA 77 fermentado com a levedura em tablete em 72 horas de fermentação.

O tempo de fermentação exerce influência na produção de álcool. Para o clone de batata-doce UGA 05 a produção de álcool tende a aumentar em função do tempo de fermentação.

O estudo do meio fermentativo sugere que a adição de nutrientes não contribuiu significativamente na produção de etanol, pois os melhores resultados foram obtidos na condição sem nutrientes e no tempo de 72 horas de fermentação.

As leveduras empregadas na fermentação dos clones de batata-doce apresentam diferenças entre si e comportam-se como efeito significativo no processo fermentativo, que varia de acordo com o genótipo utilizado.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Estudar as condições de hidrólise, como tempo, pH, temperatura, gelatinização do amido. Investigar o comportamento enzimático em relação a variação da solução empregada como meio de ação das enzimas que promovem a sacarificação do amido. Trabalhar com a viscosidade do mosto e grau Brix.

Estudar o efeito das concentrações das leveduras empregadas e investigar a reação de fermentação em função da adição de $N_{2(g)}$, ou seja, verificar se há diferença na produção de etanol obtido nas condições do meio aerado e desaerado. Realizar ensaios de fermentação sob diferentes condições de temperatura, pois esta foi fixa em 36°C. Variar o reator empregado no processo, para um comprado comercialmente e/ou elaborar um reator com saída de gás.

Como o genótipo de batata-doce que gerou melhores resultados foi a UGA 77 que apresenta na sua composição maior teor de açúcar, verificar o comportamento em outros genótipos com elevados teores de açúcar, que podem ser obtidos com o cultivo sob diferentes fertilizantes e adubo. Testar a fermentação com a batata-doce in natura, ou seja, com a massa fresca.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEHLE, Wolfgang. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. 3 ed. Darmstadt: Wiley-vch, 2007, 516p.

ABNT Associação Nacional de Normas Tecnicas, NBR 13920.

AMARAL, L. I. V. do, et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, vol 34. p. 425 – 431, 2007.

ANEEL, Atlas da energia elétrica nacional, Agência Nacional de Energia Elétrica, Brasília, p.54, 2002.

ANFAVEA, Anuário da Indústria Automobilística Brasileira, Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. 2011.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em 20 nov. 2012.

APAR, D. K., OZBEK, B., alfa-Amylase inactivation during corn starch hydrolysis process. *Process Biochemistry*, Esenler, Istambul, v. 39, n. 12, p. 1877 – 1892, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-4B22XSC-3/2/208005/ccaeeefcfd08469ae0a34a80926>. Acesso em 05/2013

BAI, F. W., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M., Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology*, v. 26, n. 1, p. 89 – 105. 2008

BELITZ, Hans-dieter. Food Chemistry, In: BELITZ Hans-dieter; SCHIEBERLE, P., GROSCHE, W., Food Chemistry: Enzymes. 4 ed. Berlin: Springer-verlag, 2009, cap 2, p.93 – 155.

BELLUCO, A. E. de S.; Alterações fisiológicas e de composição em *saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, SP, 2001.

BNDES. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável, Rio de Janeiro: BNDES. 2008 316p.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A., Introdução à química de alimentos. Ed. 3. São Paulo, Varela, p. 238, 2003.

BRENDA Database: The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org> Acesso 10/ 2012

BRINGHENTI, L.; Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos a partir da agroindustrialização da mandioca. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, UNESP – Campus Botucatu, SP, 2004.

INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Patente BRPI1001958, SISTEMA DE PARTIDA A FRIO DE ALTA PERFORMANCE PARA MOTOR DE COMBUSTÃO INTERNA A ETANOL E / OU DO TIPO FLEX OU MULTICOMBUSTÍVEL. Titular: Indebrás Indústria Eletromecânica Brasileira Ltda. Inventor: Jayme Roberto Vargas da Silva. Data do depósito 07/06/2010.

CAMARGO, L. K. P. Produtividade, caracterização físico-química e análise sensorial de frutos de morangueiro obtido de diferentes sistemas. Revista Ambiência, 2009.

CARDONA, C. A., SANCHEZ, Ó. J., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from diferentes feedstocks. Bioresource Technology, v. 99, n. 13, p. 5270 – 5295. 2007.

CARDOSO E SOUZA; A.F.B. 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. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Tocantins. Palmas-TO. 2005.

CARVALHO, R. V. de, et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. E hidrólise de amidos pela ação da enzima. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 2008, v. 28, n. 2, p. 380 – 386.

CEREDA, M. P., DAIUTO, E. R., VILPOUX, O., Metodologia de determinação de amido por digestão ácida em micro-ondas. Revista ABAM, 2004, 29p.

CEREDA, M. P. CAETÂNEO, A., Avaliação de Parâmetros de qualidade de fécula fermentada de mandioca. Revista Brasileira de Mandioca, Cruz das Almas, v. 5, n. 2, p. 55 – 62, 1986.

CEREDA, M. P., VILPOUX, O. F., Propriedades gerais do amido. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, v. 1, cap. 6, p. 530 – 575. Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas.

CINELLI, A. B. Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia, Rio de Janeiro, 2012.

DEMIATE, I. M., WOSIACK, G., CZELUSNIAK, C., NOGUEIRA, A., Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos. Comparação entre Método Colorimétrico e Totulométrico. PUBLICATIO UEPG, Ciências Exatas e da Terra, C. Agrárias e Engenharias, Vol. 8 (1) p. 65 – 78, 2002.

DERRINGER, G., SUICH, R., Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology, v. 12, n. 4, p. 214 – 219, 1980.

EMBRAPA Hortaliças, Sistemas de produção, 6. ISSN 1678, versão eletrônica, 2004. Disponível em http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batatadoce/composicao_uso.htm Acesso em 05/ 2013.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética, Empresa Pública vinculada ao Ministério de Minas e Energia nos termos da lei n° 10.847, de 15 de março de 2004.

FELTRAN; J.C., VALLE; T. L., Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam): Matéria-prima alternativa para a produção de etanol. 2009.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. Química Nova, Vol. 32, n° 3, 582-587, 2009.

GONÇALVES, F. M. V., SARMENTO, S. B. S., DIAS, S. T. dos S., MARQUENIZI, N., Tratamento térmico do amido de batata-doce (*Ipomea batatas* L.) sob baixa umidade em micro-ondas. *Ciência e Tecnologia em Alimentos*, Campinas. Vol. 29. p. 270-276, 2009.

HASHEM, M., DARWISH, S. M. I., Production of bioethanol and associated by products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass & Bioenergy*, Saudi Arabia, p. 953 – 959, 2010.

HUBER, K. C., MCDONALD, A., BeMILLER, J. N., Carbohydrate Chemistry. In: HUI, Y. H., Handbook of Science, technology, and engineering: Carbohydrate Chemistry. Boca Raton: CRC Press, 2005, cap. 1, p. 1 – 23. *Food Science and Technology*.

IAL, Instituto Adolfo Lutz, Normas Analíticas. Métodos Químicos e Físicos para a Análise de Alimentos. São Paulo, IAL, 1976.

KWIATKOWSKI, J. R., MCALOON, A. J., TAYLOR, F., JOHNSTON, D. B., Modeling the process costs of fuel ethanol production by the corndry-grind. *Industrial Crops and Products*, v. 23, n. 3, p. 288 – 296, 2006.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. Produção brasileira de cana, açúcar e álcool. Disponível em: www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/estatisticas/producao/pro

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. Portaria MAPA n° 105 DOU 1/3/2013.

MARCOCCIA, R.; A participação do etanol brasileiro em uma nova perspectiva na matriz energética mundial. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de São Paulo, USP. 2007.

MATTOS, P. L. P; SOUZA, A. S. Consórcio de batata-doce com mandioca plantada em fileiras duplas. *Revista Brasileira de Mandioca*, v.6, n.2, p.27-34, 1987.

National Ethanol Vehicle Coalition, Coalizão Americana de Veículos Movidos a Etanol. Disponível em: <http://carros.hsw.uol.com.br/combustivel-flex-etanol-851.htm> Acesso em

maio de 2013.

NIBA, L., In: HUI, Y. H., Ed, Handbook of food Science, technology, and engineering: Carbohydrates – Starch. Boca Raton: CRC Press, 2005, Cap. 1, p. 1 – 23. Food Science and Technology.

NREL. Glossari of Biomass Terms. The National Renewable Energy Laboratory. U. S. Departamento f Energy. Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/glossary.html>. Acesso em junho, 2012.

PAVLAK, M. C. de M., ABREU-LIMA, T. G. de, CARREIRO, S. C., PAULILLO, S. C. de L., Estudo da fermentaçãodo hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Química Nova. Vol. 34. No. 1. P. 82-86, 2011.

PIMENTEL, D., PATZEK, T. W., Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. Natural Resources Research, v. 14,n. 1, p. 56 – 76. 2005.

POLAKOVIC, M., BRYJAK, J., Modelling os potato starch saccharification by na *Aspergillus niger* glucoamylase. Biochemical Engineering Journal, Bratislava, p. 57 – 63. 2003.

RABALHO, A. A. Isolamento de linhagens microbianas termifílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. 2002.

REGULY, J. C., Biotecnologia dos processos fermentativos: Produção de enzimas e engenharia das fermentações. Pelotas, Universitária UFPEL, vol 3, 205p., 2000.

REEVE, A., Starch Hydrolysis: processes and equipment. In: SCHENK, F. W., HEBEDA, R. E., Starch hydrolysis product: worldwide technology, produtcion and applications. New York, VCH Publishers, p. 19 – 120, 1992.

RUSSEL, I., Undestanding yeast fundamentals. In: The Alcohol Textbook. A reference for

the beverage, fuel and industrial alcohol industries: UK: Nottingham University Press, 2003.

SANDIFFIO, M. I. G.; FURTADO, A. T., 2012) A Liderança do Brasil em Fontes Energéticas Renováveis: Uma Visão a Longo Prazo. Disponível no site, data 10/03/2012. http://www.anppas.org.br/encontro_anual/encontro2/GT/GT06/mirna_andre.pdf.

SCHUCHARDT, Ulf, RIBEIRO, M. L. GONÇALVES, A. R., A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? Química Nova, v. 34, n. 2, p. 247 – 251, 2001.

SANTANA, N. B., Eficiência de hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol. Dissertação de mestrado. UFV, 2007.

SCIPIONI, G. C., Otimização do processo fermentativo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum L.*) utilizando enzimas amilolíticas. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em engenharia de processos. Universidade Estadual de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011.

SHAPOURI, H.; DUFFIELD, J. A.; GRABOSKI, M.S. Estimating the Net Energy Balance of Corn Ethanol. U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, AER-721, Washington, D.C.: USDA Economic Research Service. 1995. 24p.

SHAPOURI, H.; DUFFIELD, J.A.; WANG, M. The Energy Balance of Corn Ethanol: An Update. U.S. Department of Agriculture. U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, AER-814. Washington, D.C.: USDA Office of the Chief Economist. 2002, 20p.

SILVA, T. M.; Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus*. Tese de doutorado. Universidade Estadual de São Paulo, USP, 2009.

SILVEIRA, M.A.; Álcool Combustível - Série Indústria em Perspectiva. Batata-doce: Uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol. v. 1. p. 109-122. Brasília 2008.

SOLOMONS, G., Química Orgânica. Ed. McGraw-Hill, 1999.

STROPARO, E. Avaliação do processo de hidrólise da batata doce por enzimas comerciais e por enzimas produzidas por *A. niger* em condições otimizadas. Dissertação de mestrado em Bioenergia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, 2011.

TAVARES, J. T. de Q, CARDOSO, R. L., COSTA, J. A., FADIGAS, F. de S., FONSECA, A. A., Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. Química Nova, Vol. 33, No. 04, 805 – 809, 2010.

VENTURINI FILHO, W. G., MEDES, B. P., Fermentação Alcólica de raízes tropicais. In: CEREDA, M. P. et al. Tecnologias Usos e Potencialidades de Tuberosas Latino Americanas. Série Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, V. 3, cap. 19, p. 530 – 575. Fundação CARGILL.

VIEILLE, C.; ZEIKUS G. J.; Hiperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 65, p. 1-43, 2001.