

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

Raul José dos Santos Michel Junior

**VIABILIDADE TÉCNICA DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE  
FARELO DE ARROZ**

Santa Maria, RS  
2016

**Raul José dos Santos Michel Junior**

**VIABILIDADE TÉCNICA DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE FARELO  
DE ARROZ**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de Concentração em Engenharia Agroambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Agrícola**.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

José dos Santos Michel Junior, Raul  
VIABILIDADE TÉCNICA DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE  
FARELO DE ARROZ / Raul José dos Santos Michel Junior.-  
2016.  
73 p. ; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2016

1. Produção de etanol 2. Farelo de arroz 3. Hidrólise  
de amido I. Antonio Mazutti, Marcio II. Título.

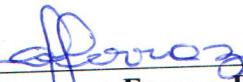
Raul José dos Santos Michel Junior

**VIABILIDADE TÉCNICA DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE FARELO DE ARROZ**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Área de Concentração em Engenharia Agroambiental aplicados à agricultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Agrícola**.

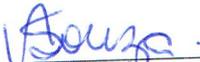
Aprovado em \_\_ de \_\_\_\_ de 2016:

  
\_\_\_\_\_  
**Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Rafael Camargo Ferraz, Dr. (UNIPAMPA)**

  
\_\_\_\_\_  
**Flávio Mayer, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Evandro Stoffels Mallmann, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Angélica Rossana Castro de Souza, Dra.(Examinadora Externa)**

Santa Maria, RS  
2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Raul José dos Santos Michel e Dilma Adler Michel a minha esposa Elza Andrade Michel e aos meus filhos Jéssica Andrade Michel e Dérick Andrade Michel, por serem minhas fontes de inspiração, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao meu amado Deus, que com seu amor incondicional e sua imensa graça tem me dado forças para enfrentar todos os obstáculos da vida, permitindo que eu realize todos os meus sonhos.

Aos meus pais, Raul José dos Santos Michel e Dilma Adler Michel. À minha esposa, Elza Andrade Michel, da qual sempre tive apoio total e um amor incondicional, e aos meus filhos, Jessica Andrade Michel e Derick Andrade Michel. Minha felicidade não se realizaria sem a participação de vocês.

Ao professor Marcio Antonio Mazutti, obrigado pela orientação exemplar, pautada por um elevado e rigoroso nível científico, contribuindo para enriquecer todas as etapas subjacentes ao processo de investigação. Obrigada pela confiança depositada, pela oportunidade oferecida, pela partilha do saber, por estimular o meu interesse pelo conhecimento, pelo acompanhamento incansável nesta jornada, encorajando-me para que eu prosseguisse e concluísse este trabalho. Orgulho-me de ter desenvolvido este estudo sob a sua orientação. Acima de tudo, obrigada por ter sido responsável pelo meu amadurecimento profissional. Jamais teria ido tão longe sem o seu auxílio, amizade e dedicação. Meu profundo respeito, admiração e gratidão.

Aos alunos de pós-graduação que fizeram parte da equipe, contribuindo para a realização dos experimentos. Agradeço especialmente os doutorandos Nicholas Canabarro e Thiago Castro de Almeida e as estudantes de graduação Jéssica de Moura Lima e Vitoria Scarpini Porto.

Agradeço também ao Senhor José Luiz Limana, proprietário da empresa LimanaPoliserviços, pela compreensão do momento que tive que enfrentar.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

*Quem vence sem riscos triunfa sem dignidade*

*(Augusto Cury)*

## RESUMO

### VIABILIDADE TÉCNICA DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE FARELO DE ARROZ

AUTOR: Raul José Dos Santos Michel Junior

ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti

Atualmente, existe grande preocupação em relação ao consumo de combustíveis fósseis, bem como um possível esgotamento das tradicionais fontes de produção de matéria-prima, principalmente os derivados de hidrocarbonetos. Paralelamente a isso, os desafios com a preservação do meio ambiente trazem para as discussões questões que envolvem os biocombustíveis e seus meios de obtenção. Isso posto, essa questão ambiental ainda traz grandes preocupações referentes à utilização de matérias primas que exijam menos gastos energéticos, bem como evitar a disputa por terras destinadas à produção de alimentos, o que acaba entrando na pauta das externalidades envolvendo o tema. No caso da produção de etanol de fontes amiláceas, os processos tradicionais ainda apresentam elevados custos de produção associados às enzimas empregadas e à grande demanda energética para a gelatinização do amido com altas temperaturas. Uma alternativa ao processo de hidrólise do amido granular é a utilização de enzimas capazes de processar esses amidos a baixas temperaturas, o que torna desnecessária a gelatinização e reduz o gasto energético, também denominado sacarificação e fermentação simultânea (SSF), apresentando considerável vantagem econômica. O Brasil é um tradicional produtor agrícola, sendo que a produção de arroz é bem expressiva e tem como um dos subprodutos o farelo de arroz. Este subproduto possui baixa valor comercial e é utilizado para extração de óleo, além de funcionar como ingrediente de ração animal e como fertilizante orgânico, estando, portanto, em perfeitas condições para utilização como matéria-prima amilácea para obtenção de etanol. A partir disso, este trabalho visa investigar a utilização e a viabilidade técnica do farelo de arroz, com a utilização de enzimas comerciais. Os dados iniciais para estabelecer os parâmetros de trabalho foram retirados da literatura. Tendo em vista o grande número de variáveis, utilizou-se a metodologia Plackett-Burman, visando verificar os efeitos das principais variáveis e selecionar as que tiveram maior efeito sobre o modelo. Dessa forma para o trabalho 1 em frascos agitados foram selecionadas as seguintes variáveis: concentração de farelo, percentual de inoculo, percentual de água de milho macerada, concentração de farelo de soja, percentual de enzima, tempo de adição de levedura e percentual de celulase. Desse planejamento inicial, entre as variáveis mais significativas e que, conseqüentemente, foram selecionadas para a aplicação do planejamento Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), estão a concentração de farelo de arroz, o percentual de inoculo e o percentual de celulase. Para o trabalho 2 em biorreator de 3 litros, foram investigadas as variáveis agitação e temperatura na produção de etanol. Para análise do açúcar redutor dos experimento foi utilizado a metodologia de DNS (Miller, 1959), e para análise do etanol presente nos ensaios foram retiradas amostras e submetidas ao Alcozyzer. Para os ensaios realizados no primeiro trabalho a maior quantidade de etanol foi de 172,70 gramas de etanol por quilograma de farelo de arroz, com eficiência de 84%. Para os experimentos realizados no segundo trabalho, com reator de 3 L o melhor resultado foi 182,52 gramas de etanol por quilograma de farelo de arroz com eficiência de 89 %. Dessa forma, foi demonstrado que existe um potencial considerável para produção de etanol utilizando esta matéria-prima, tendo em vista que há a estimativa de 1 milhão de toneladas por ano, com a possibilidade de produção de 35 a 50 milhões de litros adicionais de etanol por ano.

**Palavras-chave:** Produção de etanol. Farelo de arroz. Hidrólise de amido.

## ABSTRACT

### TECHNICAL VIABILITY OF ETHANOL PRODUCTION FROM RICE BRAN

AUTHOR: Raul José Dos Santos Michel Junior

ADVISOR: Marcio Antonio Mazutti

Currently there is great concern about the consumption of fossil fuels, as well as a possible depletion of traditional sources of production of raw materials mainly hydrocarbon derivatives. Parallel challenges to the preservation of the environment bring to discussions agenda every question involving biofuels and their means of obtaining. That said this issue still has major concerns about the use of raw materials that require less energy expenditure and prevent competition for land for food production, which end up entering the agenda of externalities related with this issue. In the case of the production of ethanol from starch sources, traditional processes still have high costs associated with the production of enzymes used and the great energy demand for starch gelatinisation at high temperatures. An alternative to the granular starch hydrolysis process is the use of enzymes capable of processing these starches at low temperatures which makes it unnecessary to gelatinization and reduces energy expenditure, also called simultaneous saccharification and fermentation (SSF), resulting in considerable economic advantage. Brazil is a traditional agricultural producer, and the rice production is quite significant and is as a by-product of rice bran that has low commercial value, being used for oil extraction, as an ingredient in animal feed and as fertilizer organic therefore be in perfect conditions to be used as raw starchy material to obtain ethanol. This work aims to investigate the use of this raw material and set the parameters for increased production scale-up with the use of commercial enzymes. The initial data to establish the working parameters were taken from the literature establishing this initial data for testing. In view of the large number of variables used to Plackett-Burman methodology to verify the effects of the main variables and select the ones that have most effect on the model. Thus for the job 1 in the shake flasks were selected following parameters: concentration of bran inoculum percentage, corn percentage of water macerated, soybean concentration, enzyme percentage yeast addition time and percentage of cellulase. This initial planning, among the most significant variables and, consequently, were selected for the planning application Outlining Central Composite Rotational (CCRD), are rice bran concentration, the percentage of inoculum and the percentage of cellulase. To work 2 were investigated variables agitation and temperature in ethanol production in bioreactor 3 liters. For analysis of the experiment of reducing sugar was used DNS method (Miller, 1959), and analysis of the ethanol present in the sample specimens were removed and subjected to Alcoalyzer. For the tests performed in the first work the greatest amount of ethanol was obtained at 12 assay which was reached 172.70 grams of ethanol per kilogram of rice bran with 84% efficiency in the experiment. For experiments performed in the second study, with 3 liter reactor the best result is shown in Test 1 reaching 182.52 grams of ethanol per kilogram of rice bran with 89% efficiency. Thus, it was demonstrated that there is considerable potential for the production of ethanol using this raw material. Taking into account that the availability of this raw material is estimated at 1 million tonnes per year, the IRGA, we would have a much ethanol around 35 to 50 million liters per year.

**Keywords:** Ethanol production. Rice bran. Starch hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação dos Biocombustíveis .....	18
Figura 2	Diagrama de blocos genérico de produção de etanol combustível a partir de biomassa lignocelulósica .....	20
Figura 3	Diagrama de blocos genérico de produção de etanol combustível a partir de materiais ricos em amido .....	20
Figura 4	Partes constituintes do grão de Arroz .....	24
<b>Artigo 1</b>		
Figure 1	Pareto chart showing the effect of process variables studied in the PB12 for ethanol production. Labels: RB – rice bran; I – inoculum; C – cellulase; SB – soybean bran; A – amylase concentration; T – time for addition of the yeast; CSL – corn steep liquor. ....	43
Figure 2	Contour plots showing the influence of process variables on ethanol production: a) inoculum density and rice bran concentration; b) cellulase and rice bran concentrations; and c) cellulase concentration and inoculums density. Third variable was maintained at the central point. ....	44
<b>Artigo 2</b>		
Figura 1	Gráfico de pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes na produção de etanol .....	56

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

Table 1	Rice bran composition (dry basis) .....	32
Table 2	Matrix of the results obtained in the PB12 for screening of significant variables for ethanol production .....	39
Table 3	Matrix of the results obtained in the CCRD for optimisation of ethanol production 40	40
Table 4	Analysis of variance (ANOVA) for the terms of quadratic model presented in Eq. 2 .....	41

### Artigo 2

Tabela 1	Matriz experimental contendo os resultados referentes à produção de etanol e a eficiência de conversão do amido ao final do processo fermentativo .....	53
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMM	Água de maceração de Milho
ART	Açúcar Redutor Total
CBF	Bi processo Consolidado
CE	Comissão Europeia
CF	Co-fermentação
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DER	Diretiva de Energias Renováveis
DNS	Ácido Dinitro-Salicílico
DME	Dimetil éter
EUA	Estados Unidos da América
Fe <sup>2+</sup>	Íons de Ferro
GEE	Gases de Efeito Estufa
GEE	Gases de efeito estufa
IRGA	Instituto Rio-grandense do Arroz
IC	Índice de Cristalividade
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fostato de Potássio Dibásico
KCl	Cloreto de Potássio
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnésio
Mg <sup>2+</sup>	Íons de Magnésio
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de Amônio
OPEP	Organização dos Países Exportadores de Petróleo
PB	Delineamento Plackett-Burman
pH	Potencial Hidrogeniônico
RFS	Renewable Fuel Standard;
RNA	Ácido Ribonucléico
SSF	sacarificação e fermentação simultânea
SSCF	Sacarificação Simultânea e co-fermentação
SSYPF	Simultânea sacarificação propagação da levedura e fermentação
Zn <sup>2+</sup>	Íons de Zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1	OBJETIVOS .....	15
<b>1.1.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1	BIOCOMBUSTÍVEIS .....	16
2.2	ETANOL .....	18
2.3	PROCESSOS DE PRODUÇÃO DO ETANOL A PARTIR DE BIOMASSA .....	19
2.4	MATÉRIAS-PRIMAS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL .....	21
2.5	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS .....	22
2.6	FARELO DE ARROZ .....	23
<b>2.6.1</b>	<b>Produção de etanol a partir do farelo de arroz .....</b>	<b>25</b>
2.7	IMPORTÂNCIA DE AVALIAR O AUMENTO DE ESCALA .....	25
2.8	AGITAÇÃO .....	28
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1 – ENZYMATIC SACCHARIFICATION AND FERMENTATION OF RICE PROCESSING RESIDUE FOR ETHANOL PRODUCTION AT CONSTANT TEMPERATURE .....</b>	<b>29</b>
3.1	ABSTRACT .....	30
3.2	INTRODUCTION .....	31
3.3	MATERIAL AND METHODS .....	32
<b>3.3.1</b>	<b>Materials .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Microorganism and inoculum .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Experimental procedure for enzymatic saccharification and fermentation .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Fermentable sugar and ethanol determination .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Calculations and Statistical analysis .....</b>	<b>34</b>
3.4	RESULTS AND DISCUSSION .....	34
3.5	CONCLUSIONS .....	36
3.6	REFERENCES .....	36
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO O FARELO DE ARROZ COMO MATÉRIA PRIMA .....</b>	<b>45</b>
4.1	RESUMO .....	46
4.2	ABSTRACT .....	46
4.3	INTRODUÇÃO .....	47
4.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	49
<b>4.4.1</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Microrganismo e inóculo .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Procedimento experimental para sacarificação enzimática e fermentação .....</b>	<b>49</b>
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4.6	CONCLUSÕES .....	51
4.7	REFERÊNCIAS .....	51
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>ETAPAS FUTURAS .....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A atual economia mundial é altamente dependente de várias fontes de energia fósseis, como petróleo, carvão, gás natural (dentre outras), utilizadas para a produção de combustível, eletricidade e outros bens (UIHLEIN; SCHBEK, 2009). Com o consumo excessivo de combustíveis fósseis, especialmente nos grandes centros urbanos, resultou na geração de elevados níveis de poluição ao longo das últimas décadas, contribuindo com o aumento drástico dos níveis de gases de efeito estufa na atmosfera terrestre (BALLESTEROS; NEGRO et al., 2006).

Nesse cenário, outras fontes de energias podem servir como uma alternativa. Segundo Iye (2013), a produção global de biocombustíveis cresceu no ano de 2000, de 16 milhões de m<sup>3</sup> para mais de 100 milhões de m<sup>3</sup> no ano de 2010. Hoje os biocombustíveis oferecem cerca de 3% do total de combustível de transporte rodoviário em nível mundial, com ações de implementação consideravelmente mais elevadas alcançadas em alguns países. Grandes mudanças na produção de biocombustíveis têm ocorrido em muitos países, como resultado de políticas governamentais introduzidas para incentivar a produção e/ou consumo de biocombustíveis.

O bioetanol é considerado uma das fontes energéticas renováveis com baixa emissão de carbono, tornando-se uma promissora alternativa para substituir o petróleo, além de sua produção estar sendo promovida por muitos países (BOTHAST, 2005; LIN, 2006). A maior parte do bioetanol é produzida a partir de matérias-primas oriundas da cana-de-açúcar, do milho, do trigo e da cevada. No entanto, o uso dessas culturas para produzir bioetanol compete com áreas agrícolas utilizadas para produção de alimento. Essa competição teve um grande impacto mundial nos preços de alimentos e rações (SHINOZAKI; KITAMATO, 2010).

Em 2011, a produção mundial de bioetanol atingiu 84,6 milhões de m<sup>3</sup>, sendo os EUA e o Brasil responsáveis por 87,1% dessa produção, tendo o milho e a cana-de-açúcar como matéria-prima, respectivamente (IYE, 2013). A produção de biocombustíveis de primeira geração, como o etanol de milho nos EUA e o etanol de cana-de-açúcar no Brasil, é caracterizado por mercados comerciais maduros e com domínio total das tecnologias, com pouco ou nenhum espaço para melhoria de processos.

Pesquisas na área de produção de bioetanol focam seus estudos na utilização desses resíduos agrícolas como coproduto para produção desse biocombustível, pelo fato de ser matéria-prima de baixo custo –podendo tornar seu processo financeiramente viável –, não

havendo necessidade de desmatamento para a ampliação de áreas plantadas para obtenção de matéria-prima. Contudo, os resíduos agrícolas mais utilizados para essa finalidade são oriundos do cultivo da beterraba, da cevada, da aveia, da batata, do milho, da mandioca e do arroz. Segundo Kim e Dale (2004), esses resíduos podem ser obtidos nas indústrias alimentícias ou nas áreas agrícolas no momento da colheita.

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial (WALTER et al., 2008). A China, a Índia, a Indonésia e Bangladesh, juntas, produzem em torno de 750 milhões de toneladas deste cereal, segundo a FAO (Food and Agriculture Organization das Nações Unidas, 2015).

O Brasil é o nono maior produtor mundial e colheu 11,26 milhões de toneladas na safra 2009/2010. A produção está distribuída principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso. As projeções de produção e consumo de arroz, avaliadas pela Assessoria de Gestão Estratégica do Mapa, mostram que o Brasil vai colher 14,12 milhões de toneladas de arroz na safra 2019/2020. Isso significa um aumento anual de produção de 1,15% nos próximos dez anos. O consumo deverá crescer a uma taxa média anual de 0,86%, alcançando 14,37 milhões de toneladas em 2019/2020. Assim, a importação projetada para o final do período é de 652,85 mil toneladas. Essa taxa anual projetada para o consumo de arroz nos próximos anos, 0,86%, está pouco abaixo da expectativa de crescimento da população brasileira.

A cadeia produtiva do arroz ainda enfrenta vários problemas, ainda que ela seja extremamente tecnificada, especialmente no que diz respeito ao grande volume de resíduos gerados pelo seu beneficiamento, os quais apresentam difícil manejo e/ou baixo valor comercial (SILVA et al., 2006; LIMBERGER et al., 2008). Como subproduto do beneficiamento e do processamento do arroz em casca, resultam a casca (entre 20 e 33%), o arroz quebrado (10 e 15 %) e o farelo (cerca de 5 a 8%) (VIEIRA; CARVALHO, 1999). O farelo de arroz consiste em algumas camadas externas do arroz integral que são retiradas para a produção do arroz polido (HOFFPAUER, 2005). Algumas parcelas de resíduos podem produzir bio-gás (MENARDO et al., 2015), bio-hidrogênio (RAMAPRAKASH e MUTHUKUMAR, 2014) e bio-óleo (ALVAREZ et al., 2014).

No Brasil, o farelo de arroz possui baixo valor comercial, sendo utilizado para extração de óleo, como ingrediente da ração animal e como fertilizante orgânico. É também utilizado em multimisturas, tostado de forma caseira, sendo distribuído a famílias de baixa renda (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006).

No processo de beneficiamento do arroz, o farelo de arroz se destaca como importante subproduto, o qual, segundo o Instituto Rio-grandense do Arroz, vem sendo subaproveitado no montante de mais de um milhão de toneladas/ano (CHAUD et al., 2009). Uma das preocupações que existe nos processos para obtenção de etanol utilizando matérias-primas amiláceas refere-se às altas temperaturas empregadas para obtenção de hidrólise e sacarificação desses produtos. Nesse sentido os custos decorrentes da elevada demanda energética, tais produtos podem ser reduzidos se a etapa de hidrólise for realizada em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização do amido, ou seja, sobre o amido granular (processo conhecido como *coldhydrolysis*) (ROBERTSON et al., 2006), propiciando vantagem sob o ponto de vista econômico. Nesse processo, diferentemente dos processos convencionais, é necessária a ação conjunta de um “complexo” enzimático sobre o amido na forma granular, eliminando os processos de liquefação e cozimento e permitindo a redução no consumo de energia (GALVEZ, 2005).

A hidrólise do amido granular (ou hidrólise a frio) é um processo que tem vantagens em relação aos métodos convencionais, pode-se citar: redução da viscosidade do meio líquido, menor investimento de capital, menores custos de manutenção e de insumos associados a essas operações e rendimentos potencialmente maiores (TEXTOR et al., 2003).

Outra vantagem potencial apresentada por esse processo se deve à sua condução envolvendo sacarificação e fermentação simultânea (SSF), tornando possível uma rápida conversão dos açúcares em etanol assim que eles são formados, diminuindo seu acúmulo no meio. Tendo em vista que os açúcares são inibitórios para o processo, a utilização de SSF aumenta os rendimentos e as concentrações de etanol, em comparação com processos em que essas etapas são realizadas separadamente (WYMAN et al., 1992; CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como finalidade investigar a viabilidade técnica do subproduto do arroz (farelo), sendo um resíduo não convencional, e matéria-prima de baixo valor agregado à base de amido, o que o torna um subproduto atraente para produção de etanol dentro do conceito de biorrefinaria.

O presente trabalho foi estruturado em 2 artigos, no qual é realizada uma introdução geral ao tema e posteriormente os seus resultados são apresentados nos seguintes artigos: *Enzymatic saccharification and fermentation of rice processing residue for ethanol production at constant temperature* e *Influência das variáveis temperatura e agitação na produção de etanol utilizando o farelo de arroz como matéria-prima*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

Avaliar a produção de etanol a partir de um resíduo agroindustrial com percentual elevado de amido (farelo de arroz) pelo processo enzimático a frio (*ColdHydrolysis*).

### 1.1.2 Específicos

1. Otimizar o meio de fermentação, avaliando o efeito de diferentes variáveis como pH, quantidade de farelo de arroz, percentual de inóculo, percentual de água de milho macerado, percentual de farelo de soja, quantidade de amilase (Stargen 002®), tempo de adição da levedura e percentual de celulase na produção de etanol, em escala de bancada conduzidos em laboratório;
2. Otimizar o processo de fermentação do etanol em um biorreator de 3L, com as mesmas variáveis selecionadas anteriormente além da temperatura e com agitação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Com a crescente industrialização e o aumento no número de automóveis em todo o mundo, houve um forte crescimento no consumo de combustíveis derivados de petróleo (AGRAWAL, 2007). Os combustíveis fósseis representam 80% da energia primária consumida no mundo, dos quais 58% são consumidos pelo setor dos transportes (ESCOBAR et al., 2009).

O aumento da demanda energética tende a levar a um aumento no preço do petróleo bruto, afetando diretamente a atividade econômica global (HE; WANG, 2010). O progressivo esgotamento dos combustíveis fósseis convencionais, dado em virtude do aumento do consumo de energia e consequentes emissões de gases de efeito estufa, tem levado a um movimento mundial em direção à utilização de energias alternativas, renováveis e sustentáveis, eficientes e de baixo custo, utilizando como fontes alternativas para produção de energia que requerem menores demandas energéticas (SING et al.2010; PRASAD et al. 2007; SINGH 2010; PRASAD et al., 2007).

O estudo de temas relacionados às energias renováveis vem ganhando destaque nos fóruns de discussão sobre desenvolvimento sustentável em todo o mundo. A mudança de paradigma energético tornou-se uma necessidade, levando-se em consideração os impactos econômicos, sociais e ambientais que os combustíveis derivados do petróleo geram na sociedade contemporânea (CERQUEIRA; MACEDO, 2012). Grandes mudanças na produção de biocombustíveis têm ocorrido em muitos países, como resultado de políticas governamentais introduzidas para incentivar a produção e/ou consumo de biocombustíveis. Os EUA têm promovido os biocombustíveis desde 1978 com uma variedade de políticas e subsídios para tornarem-se atualmente o líder mundial na produção de bioetanol (TYNER, 2008). Em 2005, a agência de política energética estabeleceu um padrão de combustível renovável (Renewable Fuel Standard, RFS) que determina metas específicas para o uso de combustíveis renováveis com base no tipo de matéria-prima e sua intensidade de gases de efeito estufa(GEE) em relação aos combustíveis fósseis (HUANG et al., 2013). Essa mesma agência estimou, para 2015, uma produção de 57 bilhões de litros de biocombustíveis de 1ª geração (principalmente o etanol de milho), e 60,5 bilhões de litros de etanol celulósico para 2022.

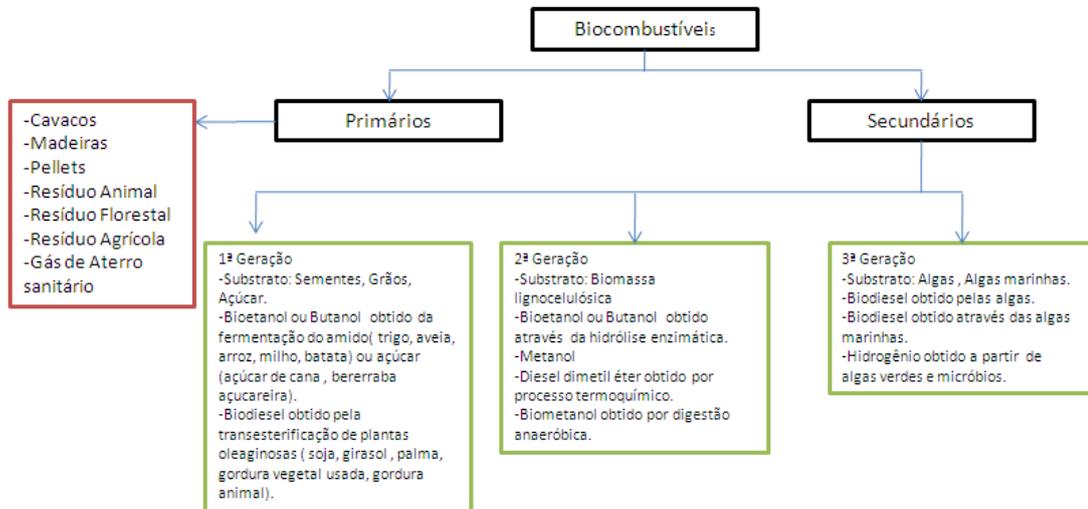
Na Europa, em 2003, a Comissão Europeia estabeleceu a meta Diretiva 2003/30/CE, em que deveria ser atingida uma cota de 5,75% de energias renováveis para o setor dos transportes dos países membros até 2010. Em 2009, foi estabelecido um aumento como parte da Diretiva de Energias Renováveis ( Diretiva 2009/28/CE), para um mínimo de 10% até 2020. Em 2011, a produção de bioetanol mundial atingiu 84,6 milhões de m<sup>3</sup>, com os EUA e o Brasil sendo responsáveis por 87,1% dessa produção a partir do milho e da cana de açúcar como matéria-prima, respectivamente. A produção de biocombustíveis de primeira geração, como o etanol de cana de açúcar no Brasil e etanol de milho nos EUA, é caracterizada por mercados comerciais maduros e com domínio total da tecnologia (IYE, 2013), com pouco ou nenhum espaço para melhoria nos processos. Por isso, no futuro, é improvável que os custos de produção possam ser reduzidos significativamente.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana. Em 1961, foi responsável por 85% do total de cana produzida nos países do MERCOSUL e, desde então, aumentou para 97%, devido aos avanços tecnológicos alcançados no Brasil em relação aos demais países. Em 43 anos, a participação do Brasil na produção mundial de cana aumentou de 16% para 34% e a produção interna, no mesmo período, cresceu 647%, e esse crescimento foi estimulado por políticas internas voltadas para aumentar o consumo do álcool como combustível (DA COSTA et al., 2010).

Entre as alternativas de energia, os biocombustíveis, o hidrogênio e o gás natural podem emergir como importantes fontes estratégicas de combustíveis sustentáveis em um futuro próximo. Dentre essas fontes, os biocombustíveis são considerados os mais favoráveis ao meio ambiente como fonte de energia, tendo um futuro promissor (POONAM; ANOOP, 2011).

Os biocombustíveis podem ser classificados como primários e secundários, conforme pode ser verificado na Figura 1.

Figura 1 – Classificação dos Biocombustíveis



Fonte: Poonam (2011 - adaptado).

Os primários são utilizados de forma não processada e de forma direta, tais como lenha, cavacos e *pellets* de madeira, usados principalmente para aquecimento, cozimento ou produção de energia térmica. Os biocombustíveis secundários são produzidos por processos industriais, utilizando, por exemplo, biomassa para produção de etanol, biodiesel, dimetil éter (DME), dentre outros, os quais podem ser utilizados em veículos e em diversos processos industriais (POONAM; ANOOP. 2011). As fontes energéticas secundárias ainda são divididas em primeira, segunda e terceira geração, sendo classificadas de acordo com a matéria-prima e tecnologia utilizadas para a sua produção.

## 2.2 ETANOL

O etanol, também conhecido como álcool etílico ( $C_2H_6O$ ), é produzido desde os tempos antigos pela fermentação de açúcares presentes em produtos vegetais, tais como cereais, beterraba, batata e cana, sendo a fabricação de bebidas alcoólicas, na verdade, tão antiga quanto à civilização humana. A produção de etanol puro começou no século XII, juntamente com melhorias na “arte da destilação”. Durante a Idade Média, o álcool foi usado principalmente para a elaboração de medicamentos e para a fabricação de pigmentos (ROEHR, 2001).

Quimicamente, o álcool hidratado não apresenta diferenças quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas às

impurezas que acompanham o etanol, que são características de cada matéria-prima, e ao grau de purificação pelo qual passou o produto (LOPES, 1986).

Produzir bioetanol a partir de biomassa é de grande interesse para o país, uma vez que no território brasileiro existe uma grande biodiversidade, o que gera variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais. Quando se tem a glicose livre na fonte de produção, como no caso do caldo da cana-de-açúcar, denomina-se o produto final como bioetanol de primeira geração; entretanto, quando a etapa de sacarificação é necessária, caso a glicose se encontre em forma de amido ou celulose, denomina-se bioetanol de segunda geração.

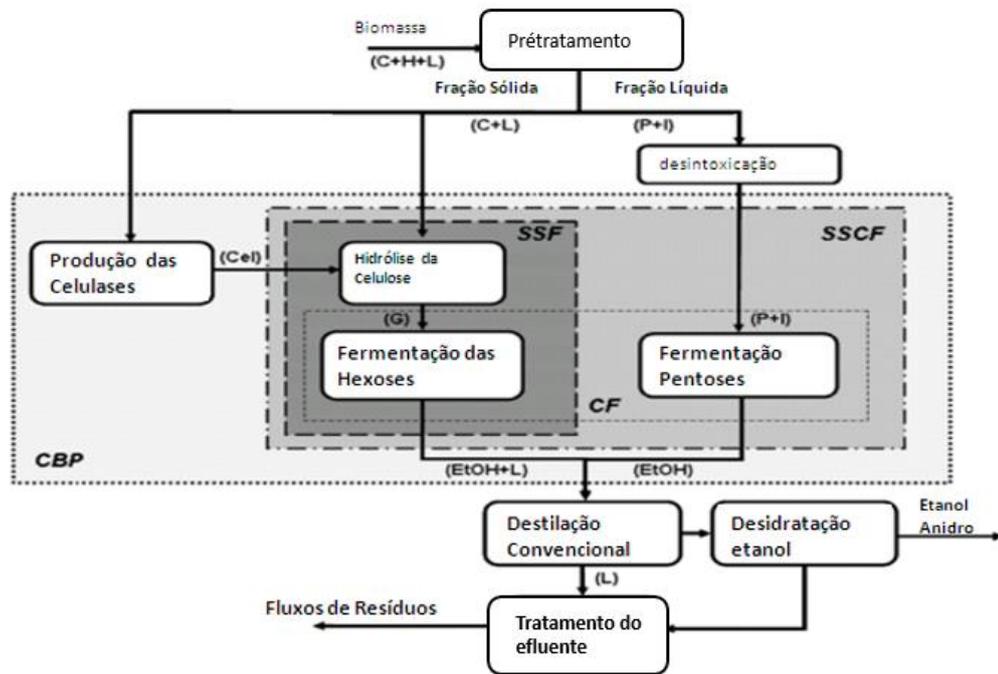
### 2.3 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DO ETANOL A PARTIR DE BIOMASSA

O desafio mais importante do processamento na produção de biocombustível é o pré-tratamento da biomassa. A biomassa lignocelulósica é composto por três componentes principais a saber hemicelulose, lignina e celulose. Os métodos de pré-tratamento referem-se a solubilização e separação de um ou mais destes componentes de biomassa. Isto faz com que a biomassa sólida restante seja mais acessível ao ataque químico ou tratamento biológico. (DEMIRBAS, A. 2005).

A melhoria do processo biológico envolve agora a sacarificação e a fermentação simultânea, denominada SSF. Na etapa seguinte, o amido transformado em açúcares fermentescíveis pelo processo SSF é convertido em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (NIKOLIC et al., 2010).

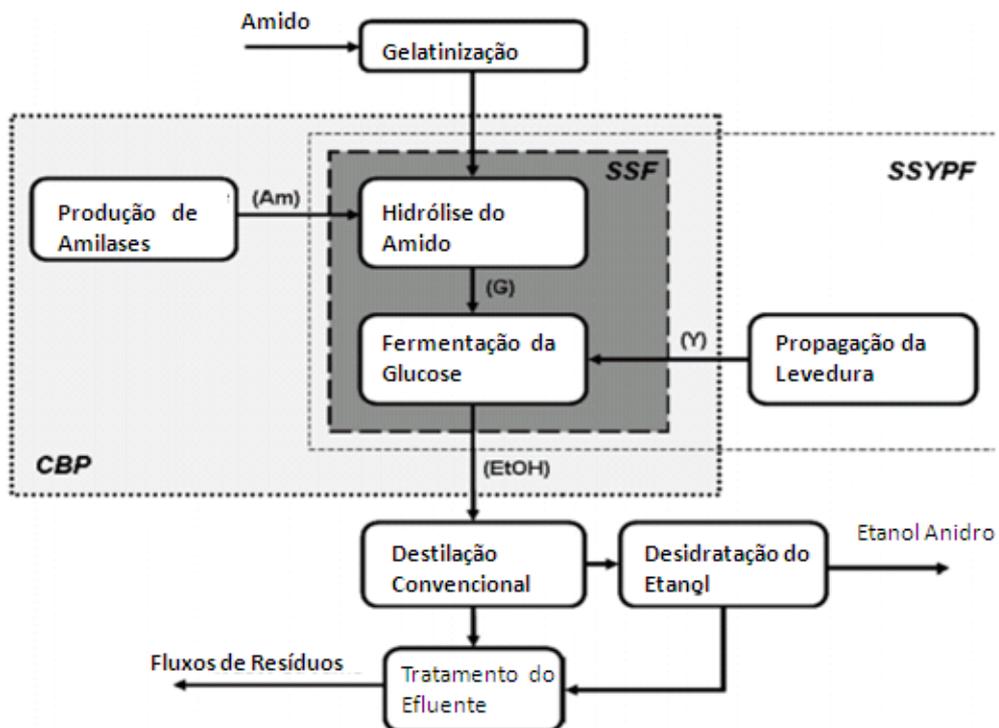
Um dos avanços mais importantes relacionados ao processo de produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas é a implementação no desenvolvimento da sacarificação e fermentação simultânea, denominado processo (SSF), no qual a degradação enzimática da celulose (ver Figura 2) ou amido (ver Figura 3) é combinado com a fermentação de glicose obtida a partir da hidrólise destes polissacarídeos.

Figura 2 – Diagrama de blocos genérico de produção de etanol combustível a partir de biomassa lignocelulósica



Fonte: CARDONA (2007 - adaptado).

Figura 3 – Diagrama de blocos genérico de produção de etanol combustível a partir de materiais ricos em amido



Fonte: Adaptado de CARDONA (2007 – adaptado).

A melhoria do processo de hidrólise e sacarificação e fermentação (SSF) simultânea a partir de biomassa é a sua capacidade para rapidamente converter o açúcar em etanol, logo que eles são formados, diminuindo a sua acumulação no meio. Também se observa que os açúcares são muito mais inibitórios para o processo de conversão do que o próprio etanol. O processo SSF pode alcançar taxas mais elevadas, de produtividade e concentrações de etanol em comparação com a hidrólise e fermentação separada (SHF), na medida que são convertidos em açúcares (WYMAN et. al., 1992).

## **2.4 MATÉRIAS-PRIMAS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL**

Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica para obtê-lo é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país. Sua privilegiada distribuição geográfica, que abrange diversos climas e tipos de solos, permite a produção em quase todo o território e durante todo o ano. Qualquer matéria que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima potencial para a obtenção de etanol (AQUARONE et al., 2001).

As matérias primas podem ser classificadas como: i) açucaradas, agrupando cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas; ii) amiláceas e feculentas, agrupando grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos tais como mandioca, batata doce e babaçu; e iii) lignocelulósicas, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel (STUPIELLO, 1982).

Ainda conforme Stupiello (1982), mesmo que todo produto contendo carboidratos transformáveis em álcool (sacarose, glicose, frutose, amido, celulose, etc) possa ser considerado matéria-prima para fermentação alcoólica, são imprescindíveis considerações sobre os seguintes pontos: custo de aquisição da matéria-prima; facilidade de transformação; rendimento em álcool etílico; disponibilidade e possibilidade de expansão; fonte de energia empregada.

Dentre as matérias-primas açucaradas, costuma-se distinguir as diretamente fermentescíveis e as não diretamente fermentescíveis. As primeiras contêm monossacarídeos e se limitam aos sucos de frutas. Sua importância reside na produção de álcool etílico em bebidas como o vinho e a cidra. As não diretamente fermentescíveis são as que contêm dissacarídeos que fermentam após uma hidrólise, à qual se dá o nome de inversão e que se realiza naturalmente por ação da invertase, enzima produzida pelo agente de fermentação. A

sacarose é a representante mais importante dos componentes da cana-de-açúcar e dos melaços (AQUARONE et al., 2001).

Para uma determinada linha de produção, a comparação das matérias-primas inclui várias questões : (1) Composição química da biomassa; (2) práticas de cultivo; (3) disponibilidade de terra e uso e práticas; (4) uso de recursos; (5) balanço de energia; (6) emissão de gases de efeito estufa; (7) absorção de minerais e água do solo; (8) aplicação de pesticidas; (9) erosão do solo; (10) contribuição para a biodiversidade e perdas de valor da paisagem; (11) preço da biomassa; (12) custo de logística; (13) valor econômico das matérias-primas; (14) criação e manutenção de empregos; (15) requisitos e disponibilidade de água (GNANSOUNOU, et al., 2005).

## 2.5 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os materiais lignocelulósicos são os recursos renováveis mais amplamente disponíveis a baixo custo do mundo sendo considerados aptos para a produção de etanol. Uma enorme diversificação de resíduos lignocelulósicos estão disponível em todo o mundo. Cana de açúcar, bagaço de cana, casca de arroz, farelo de arroz, cascas de amendoim, e caules de mandioca são resíduos agro-industriais agrícola e que poderiam ser considerados aptos para a bioconversão em países tropicais. (Martin C. et al,2007).O uso de produtos vegetais para a produção de bioetanol de 1ª geração e seu fornecimento é improvável que seja o suficiente para suprir a crescente demanda global para o bioetanol. O impacto cumulativo para estas preocupações têm aumentado a necessidade de desenvolvimento de segunda geração de biocombustíveis a partir de recursos alternativos de biomassa. (IYE, Edward; BILSBORROW, Paul., 2013).

Muitos resíduos podem ser transformados em subprodutos ou em matérias primas para outras linhas de produção (CEREDA et al., 2001). O Brasil é um dos países que mais produz resíduos agroindustriais, devido a sua grande atividade agrícola. Produtores e indústrias da área enfrentam o problema de descarte dos resíduos gerados que, embora sejam biodegradáveis, necessitam de um tempo mínimo para serem mineralizados constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais (CAMPOS, 2005).

Um resíduo não é, por princípio, algo nocivo, muitos resíduos podem ser transformados em subprodutos ou em matérias-primas para outras linhas de produção (CEREDA et al., 2001).

A manipulação correta de um resíduo tem grande importância para o controle do risco que ele representa, pois um resíduo relativamente inofensivo, em mãos inexperientes, pode transformar-se num risco ambiental bem mais grave ( BASTOS, 2007).

Sob o ponto de vista ambiental, a utilização de rejeitos em processos industriais tem uma grande importância, haja vista que diminui o volume dos depósitos e contribui significativamente para a redução da extração da matéria-prima utilizada. Entretanto, é necessário desenvolver estudos que avaliem a viabilidade para aplicações nobres e com valor agregado de cada resíduo, assegurando os ganhos agrônômicos, ambientais, econômicos e sociais que esse tipo de disposição representa (EMBRAPA, 2013).

A disposição, no ambiente, de resíduos gerados em diversas atividades industriais tem resultado em frequentes relatos de problemas de poluição ambiental. Tais problemas levaram as autoridades a elaborar medidas efetivas para minimizar a poluição. Entre essas medidas, podem ser citadas as reduções da quantidade de resíduos gerados, a utilização de tecnologias que permitam gerar resíduos menos poluentes, o tratamento adequado dos resíduos antes da disposição no ambiente e o aproveitamento dos resíduos em outras atividades (CEREDA, 2001).

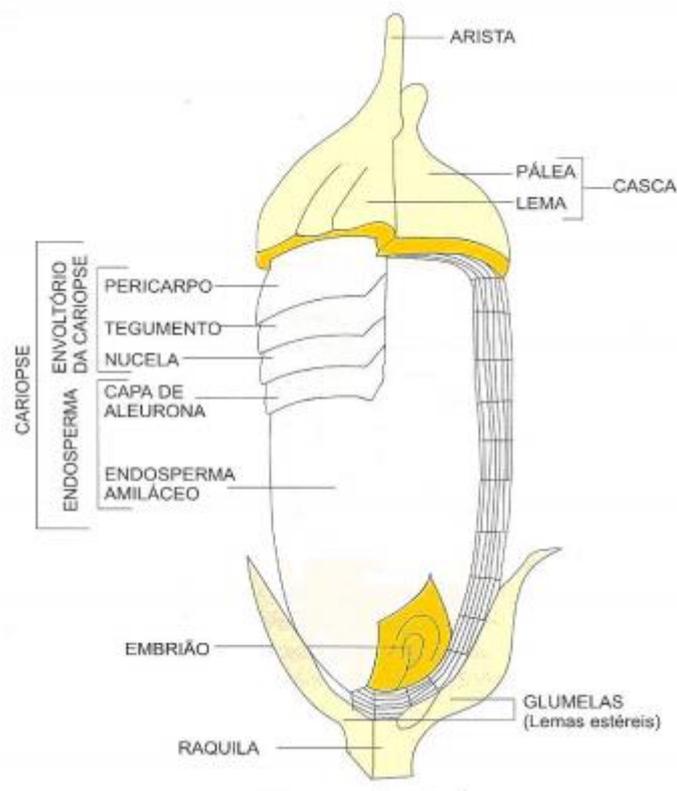
Apesar de já apresentar algumas formas de valoração, o farelo de arroz, por possuir quantidades significativas de carboidratos, proteínas, fibras insolúveis, vitaminas e minerais, e por ter produção anual muito significativa, ainda é objeto de estudo científico (BRASIL, 2012). A necessidade de ampliação da oferta de matérias primas para a produção de bioetanol, sem pressionar a área plantada de obtenção de alimentos, tem direcionado as pesquisas em busca da utilização de fontes alternativas. O etanol pode ser obtido por meio de diversas formas de biomassa, através de processos fermentativos ou de síntese, envolvendo tecnologias relativamente simples ou avançadas (BASTOS, 2007).A tecnologia de etanol celulósico depende de métodos químicos ou métodos enzimáticos para decompor a celulose em açúcar para subsequente fermentação por microrganismos, tais com *Saccharomyces cerevisiae*.(CHENG-YU Ho, 2012).

## 2.6 FARELO DE ARROZ

No processo de beneficiamento do arroz, o farelo de arroz se destaca como importante subproduto, o qual, segundo o Instituto Rio-grandense do Arroz, vem sendo subaproveitado no montante de mais de um milhão de toneladas/ano (IRGA, 2008).Para melhor esclarecimento, a obtenção do farelo de arroz se dá a partir do processo de beneficiamento do

arroz, mais especificamente na etapa de brunição, em que o arroz já descascado, integral, é lixado por máquinas compostas por pedras abrasivas que retiram o farelo. Esse material é composto pelo germe e pela película que separam o arroz branco, o qual, após passar pelo processo de polimento, torna-se o principal componente da alimentação de milhões de brasileiros (ORTIZ, 2010). O farelo de arroz corresponde a algumas camadas externas do arroz integral (Figura 4) que são retiradas para a produção do arroz polido (HOFFPAUER, 2005).

Figura 4 – Partes constituintes do grão de Arroz



Fonte: Vieira e Rabelo (2006).

O farelo de arroz é considerado um resíduo agrícola e pode ser reciclado para ser usado como matéria-prima para o desenvolvimento de processos biotecnológicos.

No Brasil, o farelo de arroz possui baixo valor comercial, sendo utilizado para extração de óleo, como ingrediente da ração animal e como fertilizante orgânico. É também utilizado em multimisturas, tostado de forma caseira, sendo distribuído a famílias de baixa renda (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006). A composição química do farelo de arroz depende de fatores associados à própria constituição do grão ou ao processo de beneficiamento. A variedade genética e as condições ambientais nas quais a planta foi

cultivada também influenciam a composição química e a distribuição dos componentes químicos do grão de arroz (CARVALHO; BASSINELO, 2006).

Farelo de arroz contém 12-23% de óleo, que é rico em ácidos graxos polinsaturados, monoinsaturados e é extraordinário na estabilidade térmica. Além disso possui os antioxidantes naturais, tais como tocoferol e orizanol. (Amarasinghe et al., 2009).

O extrato de farelo de arroz pode ser recuperado após autohidrólise – conhecido como extrato de farelo de arroz (RBE) –, podendo ser usado como uma fonte barata de Nitrogênio, reduzindo quase 50% do custo da produção de etanol (ANANDA et al., 2011). A interação de aminoácidos ou ureia com minerais e a adição de suplementos na fermentação pode melhorar o rendimento de etanol (SLININGER et al., 2009). Uma alternativa de transformação de resíduos amiláceos em coproduto é a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais que, além de reduzir os impactos ambientais desta atividade, ainda aumenta a produção da indústria alcooleira.

### **2.6.1 Produção de etanol a partir do farelo de arroz**

A produção de álcool de amido é similar ao processo fermentativo de caldo de cana-de-açúcar. As principais diferenças estão no preparo da matéria-prima e no sistema de fermentação.

No caso da cana, o açúcar para fermentação está no seu colmo, sendo necessário apenas para a extração. No caso da produção de etanol a partir de materiais amiláceos, é preciso converter o amido em açúcares para depois fermentá-lo, o que é feito por meio de cocção e hidrólise enzimática (BON et al., 2008).

O álcool etílico oriundo de matérias-primas amiláceas, como de cereais e de mandioca, destilado em equipamentos convencionais possui características organolépticas superiores às do álcool etílico da cana, devendo ser purificado (álcool neutro) quando utilizado em indústria de perfumaria ou de bebidas (VIEIRA, 2006). A hidrólise enzimática prévia faz-se necessária, pois grande parte das leveduras produtoras de etanol não é capaz de fermentar diretamente o amido. Portanto, para a produção de etanol, o amido tem que ser hidrolisado à glicose pela combinação de duas enzimas ( $\alpha$ -amilase e glicoamilase) antes de ser fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BON et al., 2008).

## 2.7 IMPORTÂNCIA DE AVALIAR O AUMENTO DE ESCALA

Quando se define o aumento e o tamanho do reator, vários problemas podem ocorrer; tais como quebras, problemas na higienização, zonas mortas (devido a falta de homogeneidade hidrodinâmica) e a presença de colônias microbianas. (WANG et al., 2010)

O aumento de escala de processos que envolvem sistemas particulados tem sido desafiador desde o advento da era industrial. Processos que antes eram manualmente realizados e guiados pela experiência foram ampliados a partir do aumento do tamanho do equipamento.

No entanto, ao contrário de muitas situações semelhantes em Engenharia Química ou Mecânica, os problemas no processamento de partículas muitas vezes não foram resolvidos pelo desenvolvimento de uma compreensão fundamental dos fenômenos físico-químicos subjacentes. Em muitos casos, as soluções para problemas de dimensionamento foram desenvolvidas por uma abordagem prática de tentativa e erro, mas que tem levado à infeliz consequência de cada geração de repetir as experiências de seus antepassados. Enquanto nossos métodos empíricos e computacionais se tornaram mais sofisticados, ainda há uma notável falta de princípios de métodos para projetos de processos de partículas (BELL, 2005).

Um problema central no aumento de escala nos processos de fermentação foram reconhecidos pela primeira vez e descritos durante a produção industrial de penicilina no início da década de 1940 (SCHMIDT, 2005). O aumento de escala em processo de fermentação é destinado à fabricação de quantidades maiores de produtos, se possível, com um aumento simultâneo ou pelo menos mantendo os níveis de rendimentos específicos e qualidade do produto. É o que se espera em um processo bem-sucedido.

A indústria biotecnológica vem crescendo rapidamente, principalmente na compreensão sobre processos biológicos complexos e também pela alta procura dos produtos biologicamente manufaturados como alimentos, bebidas, fármacos, *commodities* e produtos químicos específicos. O impacto da indústria biotecnológica na economia mundial é substancial como, por exemplo, na produção em grande escala de etanol como combustível renovável (HENSON, 2006).

No desenvolvimento de processos químicos, quando da análise prévia da viabilidade técnica e econômica do processo, em que a frequência corresponde a elevados valores para a produtividade e rendimento do produto de interesse, há necessidade de desenvolver o produto em uma escala industrial (SCHMIDELL et al., 2001). O processo de aumento de escala de

bancada para a escala de produção piloto ou industrial continua a ser uma tarefa desafiadora quando envolve os sistemas microbianos e sistemas de cultura de células (HUMPHREY, 1999; JUNKER, 2004; SCHMIDT, 2005).

Na grande maioria dos processos, o desenvolvimento natural parte de uma escala de produção menor para uma escala de produção maior. A variação de escala nesse sentido é conhecida como aumento de escala ou *scale-up*. Da mesma forma, em indústrias onde a conversão da matéria-prima em produto se baseia numa conversão biológica, entre todas as etapas que devem ser ampliadas, inclui-se a etapa de biotransformação, realizada em fermentadores. Na grande maioria dos processos, o desenvolvimento natural parte de uma escala de produção menor para uma escala maior (BHOSALE, 2003).

Na escala de bancada, tendo em vista sua maior flexibilidade e menor custo de operação, os dados básicos sobre o processo devem ser levantados dentro do maior nível de detalhes possível. Nessa etapa, são realizadas tarefas básicas, como a seleção do microrganismo e o desenvolvimento do meio de cultura ideal (SCHMIDELL et al., 2001).

Também são escolhidas as condições de temperatura e o pH para o processo, assim como a forma de operação do biorreator. Caso o processo seja aeróbio, deve-se conhecer a velocidade de consumo de oxigênio, a fim de que se possa dimensionar adequadamente o sistema de transferência de oxigênio. O levantamento de dados deve permitir a elaboração de modelos interativos (OLDSHUE, 1985).

Tendo acumulado suficiente experiência sobre o processo fermentativo em questão, e desde que se tenha atingido desempenho adequado do ponto de vista econômico, a ampliação da escala deve ser para um reator piloto. Geralmente, essa escala é mais onerosa, devendo ser mantido constante grande parte das possíveis variáveis, como é o caso de se buscar operar na mesma temperatura, no mesmo pH, na mesma forma de operação, no mesmo meio de cultura, e assim por diante (SCHMIDT, 2005).

Acumulado esse conhecimento das variáveis do processo, deve-se definir um determinado critério de ampliação de escala, ou seja, uma determinada grandeza que deverá ser a mesma na escala piloto em relação à empregada na escala de bancada. Como exemplo, pode-se pensar em manter constante o cisalhamento no reator caso as células sejam sensíveis a ele, ou manter constante o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, no caso de cultivo de células aeróbias (LONSANE et al., 1992). Assim, com esse critério fixado, opera-se a escala piloto, objetivando, obviamente, a obtenção de igual desempenho que o observado na escala de bancada.

Caso esse desempenho seja adequado, conclui-se que o critério fixado está correto e, em caso contrário, deve-se ensaiar um novo critério, novamente escolhido de acordo com o conhecimento do processo. Ainda, caso não se obtenha o sucesso esperado, alguns novos ensaios devem ser realizados na escala piloto, alterando-se ligeiramente as grandezas fixadas, a fim de melhorar o desempenho do processo. Deve-se lembrar, porém, que agora os custos operacionais são mais elevados (BHOSALE, 2003).

Assim, deve ficar claro que a ideia da operação de uma escala piloto objetiva, especialmente o teste do critério de ampliação de escala e não o estudo da influência de fatores (pH, temperatura, composição do meio, etc.). Deve-se saber que ao ampliar a escala de trabalho, vai-se deixando a condição de reator homogêneo, frequentemente observada na escala de bancada. Esse importante fato também deverá ser observado.

## 2.8 AGITAÇÃO

A agitação pode ser benéfica para o crescimento e desempenho dos microrganismos células, melhorando as características de transferência de massa no que diz respeito aos substratos, produtos derivados e /oxigênio, melhora também os processos fermentativos incrementando a produção de etanol. (RODMUI, ARISRA; et al., 2008).

Este é um dos parâmetros mais importantes, especialmente em fermentações aeróbicas, uma vez que garante homogeneidade no que se refere à temperatura e ao ambiente gasoso e fornece transferência interfacial gás-líquido, bem como a transferência de líquido para gás (BANKS, 1984). A agitação também promove a transferência de calor para massa superficial e a distribuição uniforme de nutrientes adicionados gradualmente durante o curso da fermentação. Deve ser enfatizado que a agitação não é utilizada em muitos processos aeróbios, tais como fermentações SSF e fermentações de forma estática em reatores (LONSANE et al., 1985).

O uso de agitação intermitente, é mais adequada para evitar danos ou rompimento micelial. Uma combinação da velocidade de agitação para remoção de calor para controlar a temperatura dos sólidos no nível ótimo pode também ser benéfico (LONSANE et al., 1985). Na fermentação do caldo de cana deve-se evitar durante a fermentação a aeração do mosto, já que o aumento de oxigênio faz com que o levedo transforme o açúcar em ácido acético em vez de etanol. (CARDOSO, et al., 2007). Já para CRISPIM, 2004 o fator aeração e a agitação devem ser realizadas no início da fermentação objetivando melhorar o desenvolvimento das leveduras, tendo a necessidade de se evitar durante a fermentação, pois a presença do

oxigênio pode viabilizar a formação de ácidos e outras substâncias. O uso de agitação nos sistemas de produção de etanol onde a matéria-prima farelo de arroz é utilizada se torna preponderante devido aos acúmulos formados dentro do biorreator, ocasionados pelas características do farelo de arroz. Sendo o farelo muito gorduroso a mistura se torna difícil devido a formação de bolas dentro do fermentador, outro aspecto que se observa são os acúmulos no fundo do reator, desta forma a agitação tem importância fundamental neste processo.

### 3 ARTIGO 1 – ENZYMATIC SACCHARIFICATION AND FERMENTATION OF RICE PROCESSING RESIDUE FOR ETHANOL PRODUCTION AT CONSTANT TEMPERATURE

Raul J. Santos Michel Jr., Nicholas I. Canabarro, Cláudia Alesio, Tanisa Maleski, Tiago Laber, Pamela Sfalcin, Edson L. Foletto, Flávio D. Mayer, Raquel C. Kuhn, Marcio A. Mazutti\*

Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, Brazil

BIOSYSTEMS ENGINEERING 142 (2016) 110–116



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/issn/15375110](http://www.elsevier.com/locate/issn/15375110)



#### Research Paper

## Enzymatic saccharification and fermentation of rice processing residue for ethanol production at constant temperature



*Raul J. Santos Michel Jr., Nicholas I. Canabarro, Cláudia Alesio, Tanisa Maleski, Tiago Laber, Pamela Sfalcin, Edson L. Foletto, Flávio D. Mayer, Raquel C. Kuhn, Marcio A. Mazutti\**

*Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, Brazil*

---

\*Corresponding author: [mazutti@ufsm.br](mailto:mazutti@ufsm.br) (M. A. Mazutti); Tel.: +55-55-3220-9592.

### 3.1 ABSTRACT

The aim was to investigate the enzymatic saccharification and fermentation for ethanol production. The rice bran, inoculum, corn steep liquor, soybean bran, amylase, cellulase concentrations and time of inoculum addition were evaluated using a Plackett-Burman (PB) experimental design. Furthermore, a central composite rotational design (CCRD) for three independent variables was carried out to optimise the ethanol production. Inoculum was added after 18 h of enzymatic hydrolysis and all the process was carried out at 35°C during 48 h. Maximum ethanol production was  $175 \pm 5.8 \text{ g kg}^{-1}$  obtained at 15% (m/m) concentration of inoculum, 150 g l<sup>-1</sup> of rice bran and 3 % (m/m) of cellulase. Rice bran is therefore a promising raw material for ethanol production.

**Keywords:** Saccharification. Cellulase. Amylase. Fermentation. Rice bran.

**Abbreviations:** **PB**, Plackett-Burman design; **PB12**, Plackett-Burman design with experimental runs plus three central points; **CCRD**, central composite rotational design; **TRS**, total reducing sugar; **CSL**, corn steep liquor; **SB**, soybean bran; **C**, cellulase; **A**, amylase; **I**, inoculum; **m<sub>ethanol</sub>**, mass of ethanol at the end of fermentation; **f**, theoretical glucose-to-ethanol conversion factor; **m<sub>thg</sub>**, mass of theoretical glucose obtained from starch and cellulose hydrolysis; **EtOH**, ethanol concentration calculated by Eq. 2.

### 3.2 INTRODUCTION

Rice is an important crop in countries such as China, India, Indonesia, and Bangladesh; rice production worldwide was about 750 million tonnes in 2014 (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2015). Brazil is the 9<sup>th</sup> largest rice producer worldwide and the largest one outside of Asia. Rice production for the 2014/2015 harvest in Brazil was around 12.5 million tonnes, with 8.7 million tonnes produced in the state of Rio Grande do Sul (Rice Riograndense Institute, 2015). Large amounts of residues (husk 20-33% and bran 5 - 8%) are generated during the processing of rice and they can be used for biofuel production as ethanol (DIEP et al., 2015), biogás (MENARDO et al., 2015), biohydrogen (Ramprakash and Muthukumar 2014) and bio-oil (ALVAREZ et al. 2014). Rice bran has, for some time, been seen as a potential starch-based feedstock for conversion into fermentable sugars aiming ethanol production (SAXENA et al., 2009).

Starch and cellulose fractions of rice bran can be converted to ethanol by enzymatic hydrolysis and fermentation. Simultaneous saccharification and fermentation process has been employed with more frequency for ethanol production (DIAZ et al., 2014; NARRA et al., 2015; NIKOLIĆ et al., 2011). However, in the initial phase of fermentation, the amount of sugar available in the media is low. In this condition, microbial growth is slow, affecting the ethanol production. To overcome this drawback hydrolysis and fermentation can be used consecutively. In addition, enzymes can be used for cold hydrolysis to improve sugar yield and therefore improve ethanol production without the necessity of gelatinising the starch (CINELLI et al., 2015).

Other method of increasing ethanol concentration during the distillation step is to increase the concentration of available sugars and/or improve the efficiency of *fermentation*. Sugar concentration can be increased by increasing solid (substrate) content (ERDEI et al.; 2013). A high substrate concentration is necessary to lower the overall energy utilisation and water consumption, as well as to improve the cost-effectiveness of the process (DHIMAN et al. 2015; NGUYEN et al., 2014). Some studies at high-solid content has been successfully carried out on different starch-rich substrates such as cassava flour (NGUYEN et al., 2014), whole wheat (ERDEI et al., 2013), potato tubers (SRICHUWONG et al., 2009), cassava (MAYER et al., 2015; YINGLING et al., 2011), sweet potatoes (DIAZ et al., 2014), triticale (PEJIN et al., 2015) and waste wheat-rye bread (PIETRZAK;KAWA-RYGIELSKA, 2015). However, the ethanol production from rice bran is little investigated despite the great potential of this raw material. For this reason, the aim of this work was to use rice bran as raw material

for ethanol production. Process variables for the enzymatic saccharification and fermentation of the high-solid content were optimised.

### 3.3 MATERIAL AND METHODS

#### 3.3.1 Materials

Rice bran was obtained in a local rice milling (Santa Maria-RS), which was maintained under refrigeration (4°C) until the experiments. Lignin, cellulose, and hemicellulose present in rice bran were determined using the methodology described in Van Soest et al. (1991). The composition of rice bran is presented in Table 1. Corn steep liquor was obtained from Ingredion, Brazil. The enzymes used in this study were cellulolytic complex from *Trichoderma reesei* NS50013 (Novozymes Latin American) and amilolytic complex STARGENT<sup>TM</sup> 002 (Genencor, Brazil).

Table 1– Rice bran composition (dry basis)

Components	(% m/m)
Lignin	5.4
Hemicellulose	22.9
Cellulose	9.2
Fat	16.5
Starch	30.8
Protein	15.2

Fonte: o autor

#### 3.3.2 Microorganism and inoculum

Dehydrated *Saccharomyces cerevisiae* (Fleishmann) was used as strain. Cell production for pre-inoculum was carried out in Erlenmeyer flasks using 10 ml of medium containing (g l<sup>-1</sup>): sucrose (20.0), yeast extract (5.0), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5.0), NH<sub>4</sub>Cl (1.5), KCl (1.15) and MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.65). The medium was inoculated with 1 g of dehydrated yeast and incubated at 30°C and 150 rpm for 24 h. Each Erlenmeyer flask was transferred to a 500 ml

Erlenmeyer flask with 100 ml of medium and incubated at 30 °C and 120 rpm for 24 h. The final solution is the inoculum (I).

### **3.3.3 Experimental procedure for enzymatic saccharification and fermentation**

The experiments for the enzymatic saccharification and fermentation were carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml culture medium at 35°C, pH 6.8, 120 rpm for 48 h in orbital shaker (INNOVA 44R, New Brunswick Scientific, Enfield, USA). Firstly, 90 ml of medium containing rice bran (RB) and supplements (corn steep liquor (CSL) and soybean bran (SB)) were autoclaved at 121°C for 20 min. Afterwards, the enzymes, cellulase (C) and amylase (A) were added in the previous solution and the reaction was carried out for a specific time (see Table 2) after what the inoculum (I) was added. The time for hydrolysis and fermentation was 48 h. At the end of fermentation, the ethanol and sugar concentration were determined and their values expressed in  $\text{g kg}^{-1}$  of dry substrate. The amount of supplements and enzymes were based on the amount of rice bran used in the reaction.

Plackett-Burman design with 12 runs + 3 central points (PB12) was carried out to select the most significant variables in the process. The variables investigated were rice bran concentration (100-200  $\text{g l}^{-1}$ ), inoculum concentration (5-15 % v/v), corn steep liquor concentration (CSL) (5-15 % m/m), soybean bran concentration (30-60 % m/m), amylase concentration (1-5 % m/m), cellulase concentration (0-5 % m/m) and time of inoculum addition (6-18h). A central composite rotational design (CCRD) for three independent variables was carried out to optimise the ethanol production. The variables investigated were rice bran concentration (100-200  $\text{g l}^{-1}$ ), inoculum concentration (5-15 % v/v) and, cellulase concentration (1-5 % m/m). The process kinetic was investigated at optimised condition.

### **3.3.4 Fermentable sugar and ethanol determination**

After the fermentation, the medium was centrifuged at 4°C, 15,000 rpm during 15 min for solid separation and an aliquot of 1 mL of supernatant was used to determine the amount of fermentable sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959). Other aliquot of 5 mL of supernatant was used for direct determination of ethanol content using an alcoalyzer at 25°C (Alcoalyzer Wine M/WE – Wine Analysis System - Anton Paar, Ashland, USA). The results obtained were expressed in  $\text{g [ethanol] kg}^{-1}$ [dry substrate].

### 3.3.5 Calculations and Statistical analysis

The efficiency of rice bran conversion into ethanol was calculated according to equation (1).

$$Efficiency = \frac{m_{ethanol} \cdot f}{m_{thg}}$$

(1)

Where  $m_{ethanol}$  is the mass of ethanol at the end of fermentation (g);  $f$  is the theoretical glucose-to-ethanol conversion factor, equal to 0.5111 g [ethanol] g<sup>-1</sup>[glucose];  $m_{thg}$  is the mass of theoretical glucose (obtained from starch and cellulose hydrolyses) contained in rice bran (g).

All the results were analysed using the software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considering a significance level of 90% for Plackett-Burman design and 95% for the CCRD.

## 3.4 RESULTS AND DISCUSSION

Table 2 presents the results of the PB12 for enzymatic saccharification and fermentation of rice processing residue for ethanol production. The ethanol production ranged from 224.5 gkg<sup>-1</sup> (run 3) to 93.0 gkg<sup>-1</sup> (run 10), while the results of the central points of the PB12 (13-15) demonstrated a good reproducibility of data, considering a variation lower than 6%. Data from Table 2 were used to compute the effects of variables and the respective results are presented in Fig. 1. Rice bran, inoculum and cellulase concentrations were statistically significant ( $p < 0.1$ ) in the studied range. Rice bran and cellulase concentrations presented negative effects, whereas inoculum concentration was positive. One aspect important to be mention is the fact that amylase concentration was not significant in the studied range, even rice bran being composed mainly of starch. This might be related to the fact that at level -1, the activity already was at a value enough to hydrolyse the starch without loss of efficiency. In this way, the increase from level -1 to + 1 did not influence the ethanol production.

Based on the results of the PB12, a CCRD for three variables was performed to optimise ethanol production. The results of ethanol production, total reducing sugar concentrations at different process times (0, 18, and 36 h after enzyme addition) and

conversion efficiency are shown in Table 3. Production of ethanol ranged from 105.50 (run7) to 173.70 gkg<sup>-1</sup> (run 12). The maximum total reducing sugars (TRS) concentration obtained during the enzymatic hydrolysis was 52.68 g l<sup>-1</sup> (run 10). Based on this result, it is evident that the maximum concentration of total reducing sugar does not indicate the maximum ethanol production, probably due to the inhibition of fermentation by TRS. According to Table 3, the maximum ethanol production was 173.7 gkg<sup>-1</sup> within 18 h (run 12). Also, it was observed in run 9 the lowest amount of residual sugar (2.36 g l<sup>-1</sup>) after 36 h, demonstrating that the yeast cannot convert all sugar into ethanol. It is interesting to note that the lowest concentration of residual sugar (run 9) found is related to the lowest concentration of rice bran (starch), with 10% v/v of inoculum concentration, 3% m/m of cellulase concentration. On the other hand, it is observed at run 6 that the highest concentration of residual sugar (5.57 g l<sup>-1</sup>) is associated with a rice bran concentration of 178 g l<sup>-1</sup>, 7% v/v of inoculum, and 4% m/m of cellulase.

Data from Table 3 were used to estimate the effects of the independent variables on ethanol production. These effects are related to the terms of a quadratic model, which are presented in Eq. 2:

$$EtOH = 151.95 + 4.50 \cdot RB - 12.52 \cdot RB^2 + 2.49 \cdot I + 0.33 \cdot I^2 - 0.79 \cdot C - 17.37 \cdot C^2 + 3.13 \cdot RB \cdot I + 0.68 \cdot RB \cdot C + 0.23 \cdot I \cdot C \quad (2)$$

Where: *EtOH* is the ethanol concentration (gkg<sup>-1</sup>), *RB*, *I* and *C* are the coded concentrations for rice bran, inoculums and cellulase, respectively.

This model was validated by analysis of variance (Table 4) and presented a regression coefficient (*r*) of 0.8889. Only the quadratic terms for rice bran and cellulase concentrations were significant (*p*<0.05) in the evaluated range. Both parameters were negative, indicating that there are maximum points within the range for each one of the variables. To better understand the influence of process variables on ethanol production, the model was used to build the contour plots, which are presented in Fig. 2. Thus, Fig. 2 shows the variation of ethanol production as a function of inoculum and rice bran concentrations (Fig. 2a), cellulase and rice bran concentrations (Fig. 2b) and, cellulase and inoculum concentrations Fig. 2(c).

Maximum ethanol production was obtained when the rice bran concentration ranged between 140 and 160 g l<sup>-1</sup>, cellulase concentration between 2.4 and 3.6% m/m and, inoculum concentration between 12 and 15 % v/v. Based on these results, the optimised condition for ethanol production was inoculum, rice bran and cellulase concentration of 15% m/m, 150 g l<sup>-1</sup> and 3% m/m, respectively. This condition was experimentally validated and the ethanol

concentration obtained was  $175 \pm 5.8 \text{ gkg}^{-1}$ , which is in agreement with the value predicted by the model at specified condition ( $157.06 \text{ gkg}^{-1}$ ).

The literature referring to simultaneous saccharification and fermentation of raw material presents ethanol yields slightly higher than that obtained in this study. However, it is important to point out that the majority of studies employed different temperatures for hydrolysis and fermentation. Pejin et al. (2015) obtained ethanol production in the range of  $250\text{-}350 \text{ gkg}^{-1}$  using triticale as raw material, but the sample was kept in the mashing bath at  $60^\circ\text{C}$  for 65 min for liquefaction and the fermentation carried out at  $30\text{-}35^\circ\text{C}$ . Cuevas et al. (2015) obtained  $130 \text{ gkg}^{-1}$  of ethanol using pre-treated olive-stones as substrate. Using broken rice, Li et al. (2013) obtained a production around  $280 \text{ gkg}^{-1}$ , however, the enzymatic hydrolysis was carried out at  $98^\circ\text{C}$ . Wang et al. (2015) obtained a production of  $350 \text{ gkg}^{-1}$  using cooked powder of Jerusalem artichoke tubers to release inulin as carbon source.

### 3.5 CONCLUSIONS

This study evaluated the ethanol production by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation of rice bran. Maximum ethanol production was  $175 \pm 5.8 \text{ gkg}^{-1}$  obtained at inoculum, rice bran and cellulase concentrations of 15% m/m,  $150 \text{ g l}^{-1}$  and 3% m/m, respectively. Inoculum was added after 18 h of enzymatic hydrolysis and all the process was carried out at  $35^\circ\text{C}$  during 48 hours. It was demonstrated that the rice bran can be efficiently employed for ethanol production via enzymatic saccharification and fermentation at the same temperature.

### Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES and CNPq for the financial support.

### 3.6 REFERENCES

- Alvarez J, Lopez G, Amutio M, et al. (2014) Bio-oil production from rice husk fast pyrolysis in a conical spouted bed reactor. *Fuel* 128:162–169. doi: 10.1016/j.fuel.2014.02.074
- Cinelli B a., Castilho LR, Freire DMG, Castro AM (2015) A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. *Fuel* 150:721–729. doi: 10.1016/j.fuel.2015.02.063

- Cuevas M, Sanchez S, García JF, Baeza J, Parra C, Freer J (2015) Enhanced ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated olive stones. *Renew Ener* 74:839-847. doi: 10.1016/j.renene.2014.09.004
- Dhiman SS, Haw J-R, Kalyani D, et al. (2015) Simultaneous pretreatment and saccharification: Green technology for enhanced sugar yields from biomass using a fungal consortium. *Bioresour Technol* 179:50–57. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.059
- Diaz JT, Chinn MS, Truong V-D (2014) Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweetpotatoes for ethanol production and anthocyanins extraction. *Ind Crop Prod* 62:53–60. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.07.032
- Diep NQ, Sakanishi K, Nakagoshi N, et al. (2015) Potential for rice straw ethanol production in the Mekong Delta, Vietnam. *Renew Energy* 74:456–463. doi: 10.1016/j.renene.2014.08.051
- Erdei B, Galbe M, Zacchi G (2013) Simultaneous saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production. *Biomass Bioenergy* 56:506–514. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.05.032
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. Rice Market Monitor October 2015, volume XVIII, issue No. 3. FAO Rice Market Monitor. Trade and Markets Division Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Li H, Jiao A, Xu X, Wu C, Wei B, Hu X, Jin Z, Tian Y (2013) Simultaneous saccharification and fermentation of broken rice: an enzymatic extrusion liquefaction pretreatment for Chinese rice wine production. *Bioprocess Biosyst Eng* 36:1141–1148. doi: 10.1007/s00449-012-0868-0
- Mayer FD, Gasparotto JM, Klauck E, et al. (2015) Conversion of cassava starch to ethanol and a byproduct under different hydrolysis conditions. *Starch - Stärke* 67:620–628. doi: 10.1002/star.201500043
- Menardo S, Airoidi G, Cacciatore V, Balsari P (2015) Potential biogas and methane yield of maize stover fractions and evaluation of some possible stover harvest chains. *Biosyst Eng* 129:352–359. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2014.11.010
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428.
- Narra M, James JP, Balasubramanian V (2015) Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces* sp. for ethanol production. *Bioresour Technol* 179:331–338. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.116
- Nguyen C-N, Le T-M, Chu-Ky S (2014) Pilot scale simultaneous saccharification and fermentation at very high gravity of cassava flour for ethanol production. *Ind Crop Prod* 56:160–165. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.02.004

- Nikolić S, Mojović L, Rakin M, et al. (2011) Utilization of microwave and ultrasound pretreatments in the production of bioethanol from corn. *Clean Technol Environ Policy* 13:587–594. doi: 10.1007/s10098-011-0366-0
- Pejin JD, Mojović L V., Pejin DJ, et al. (2015) Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. *Fuel* 142:58–64. doi: 10.1016/j.fuel.2014.10.077
- Pietrzak W, Kawa-Rygielska J (2015) Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat–rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. *Fuel* 147:236–242. doi: 10.1016/j.fuel.2015.01.057
- Ramprakash B, Muthukumar K (2014) Comparative study on the production of biohydrogen from rice mill wastewater. *Int J Hydrogen Energy* 39:14613–14621. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.06.029
- Saxena RC, Adhikari DK, Goyal HB (2009) Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 13:167–178. doi: 10.1016/j.rser.2007.07.011
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci* 74:3583–3597. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Srichuwong S, Fujiwara M, Wang X, et al. (2009) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass Bioenergy* 33:890–898. doi: 10.1016/j.biombioe.2009.01.012
- Yingling B, Zongcheng Y, Honglin W, Li C (2011) Optimization of bioethanol production during simultaneous saccharification and fermentation in very high-gravity cassava mash. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:329–339. doi: 10.1007/s10482-010-9494-5

Table 2 – Matrix of the results obtained in the PB12 for screening of significant variables for ethanol production

<b>Run</b>	<b>RB (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>I (% v/v)</b>	<b>CSL (% m/m)</b>	<b>SB (% m/m)</b>	<b>A (% m/m)</b>	<b>T (h)</b>	<b>C (% m/m)</b>	<b>Ethanol (gkg<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	200 (+1)	5 (-1)	15 (+1)	30 (-1)	1 (-1)	6 (-1)	5 (+1)	129.5
<b>2</b>	200 (+1)	15 (+1)	5 (-1)	60 (+1)	1 (-1)	6 (-1)	0 (-1)	141.3
<b>3</b>	100 (-1)	15 (+1)	15 (1)	30 (-1)	5 (+1)	6 (-1)	0 (-1)	224.5
<b>4</b>	200 (+1)	5 (-1)	15 (1)	60 (+1)	1 (-1)	18 (+1)	0 (-1)	118.5
<b>5</b>	200 (+1)	15 (+1)	5 (-1)	60 (+1)	5 (+1)	6 (-1)	5 (+1)	128.7
<b>6</b>	200 (+1)	15 (+1)	15 (+1)	30 (-1)	5 (+1)	18 (+1)	0 (-1)	138.5
<b>7</b>	100 (-1)	15 (+1)	15 (+1)	60 (+1)	1 (-1)	18 (+1)	5 (+1)	180.5
<b>8</b>	100 (-1)	5 (-1)	15 (+1)	60 (+1)	5 (+1)	6 (-1)	5 (+1)	117.7
<b>9</b>	100 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	60 (+1)	5 (+1)	18 (+1)	0 (-1)	172.7
<b>10</b>	200 (+1)	5 (-1)	5 (-1)	30 (-1)	5 (+1)	18 (+1)	5 (+1)	93.0
<b>11</b>	100 (-1)	15 (+1)	5 (-1)	30 (-1)	1 (-1)	18 (+1)	5 (+1)	180.5
<b>12</b>	200 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	30 (-1)	1 (-1)	6 (-1)	0 (-1)	171.1
<b>13</b>	150 (0)	10 (0)	10 (0)	45 (0)	3 (0)	12 (0)	2.5 (0)	125.6
<b>14</b>	150 (0)	10 (0)	10 (0)	45 (0)	3 (0)	12 (0)	2.5 (0)	133.9
<b>15</b>	150 (0)	10 (0)	10 (0)	45 (0)	3 (0)	12 (0)	2.5 (0)	130.8

Key: RB – Rice bran; I - inoculum concentration; CSL – corn steep liquor; SB – soybean bran; A – amylase concentration; T – time for addition of the yeast; C –cellulase concentration.

Initial amylase activity: 285.0 U<sub>g</sub><sup>-1</sup>

Initial cellulase activity: 32.4 FPU<sub>g</sub><sup>-1</sup>

Table 3 – Matrix of the results obtained in the CCRD for optimisation of ethanol production

<b>Run</b>	<b>RB</b> <b>(g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>I</b> <b>(% v/v)</b>	<b>C</b> <b>(% m/m)</b>	<b>Ethanol</b> <b>(gkg<sup>-1</sup>)</b>	<b>TRS 0 h</b> <b>(g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>TRS 18 h</b> <b>(g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>TRS 36 h</b> <b>(g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Efficiency (%)</b>
<b>1</b>	122 (-1)	7 (-1)	2 (-1)	113.2	1.54	39.19	3.23	55
<b>2</b>	122 (-1)	7 (-1)	4 (1)	116.8	1.82	39.75	4.58	57
<b>3</b>	122 (-1)	13 (+1)	2 (-1)	106.8	1.54	38.01	3.41	52
<b>4</b>	122 (-1)	13 (+1)	4 (1)	122.6	1.54	39.47	4.22	60
<b>5</b>	178 (+1)	7 (-1)	2 (-1)	111.3	1.54	36.70	3.75	54
<b>6</b>	178 (+1)	7 (-1)	4 (1)	117.3	1.48	38.22	5.57	57
<b>7</b>	178 (+1)	13 (+1)	2 (-1)	105.5	1.36	39.20	4.19	51
<b>8</b>	178 (+1)	13 (+1)	4 (1)	124.3	1.48	39.33	4.65	60
<b>9</b>	100 (-1.68)	10 (0)	3 (0)	122.4	5.67	19.86	2.36	60
<b>10</b>	200 (+1.68)	10 (0)	3 (0)	132.6	7.04	52.68	3.41	64
<b>11</b>	150 (0)	5 (-1.68)	3 (0)	153.8	6.95	41.14	3.21	75
<b>12</b>	150 (0)	15 (+1.68)	3 (0)	173.7	7.49	46.14	3.16	84
<b>13</b>	150 (0)	10 (0)	1 (-1.68)	116.7	6.72	47.40	3.33	57
<b>14</b>	150 (0)	10 (0)	5 (+1.68)	110.9	7.67	39.75	3.62	54
<b>15</b>	150 (0)	10 (0)	3 (0)	154.3	9.32	31.00	4.33	75
<b>16</b>	150 (0)	10 (0)	3 (0)	147.5	7.56	43.92	3.16	72
<b>17</b>	150 (0)	10 (0)	3 (0)	150.2	7.38	43.64	3.01	73

Key: RB – rice bran; I - inoculum concentration; C – cellulase concentration; TRS – total reducing sugar in zero (TRS 0), 18 h (TRS 18), and 36 h (TRS 36). Initial amylase activity: 285.0 U<sub>g</sub><sup>-1</sup>; initial cellulase activity: 32.4 FPU<sub>g</sub><sup>-1</sup>

Table 4 – Analysis of variance (ANOVA) for the terms of quadratic model presented in Eq. 2.

	<b>Sum of Squares</b>	<b>Degree of Freedom</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-test</b>	<b>p-value</b>
<b>RB</b>	275.72	1	275.72	1.4292	0.2708
<b>RB<sup>2</sup></b>	1761.11	1	1761.10	9.1287	0.0193
<b>I</b>	84.88	1	84.88	0.4400	0.5284
<b>I<sup>2</sup></b>	1.21	1	1.21	0.0063	0.9392
<b>C</b>	8.46	1	8.46	0.0439	0.8401
<b>C<sup>2</sup></b>	3392.00	1	3392.00	17.5825	0.0041
<b>RB x I</b>	78.13	1	78.13	0.4050	0.5448
<b>RB x C</b>	3.65	1	3.65	0.0189	0.8945
<b>I x C</b>	0.41	1	0.41	0.0021	0.9647
<b>Error</b>	1350.43	7	192.92		
<b>Total Sum of Squares</b>	6527.04	16			

Figure 1– Pareto chart showing the effect of process variables studied in the PB12 for ethanol production. Labels: RB – rice bran; I – inoculum; C – cellulase; SB – soybean bran; A – amylase concentration; T – time for addition of the yeast; CSL – corn steep liquor.

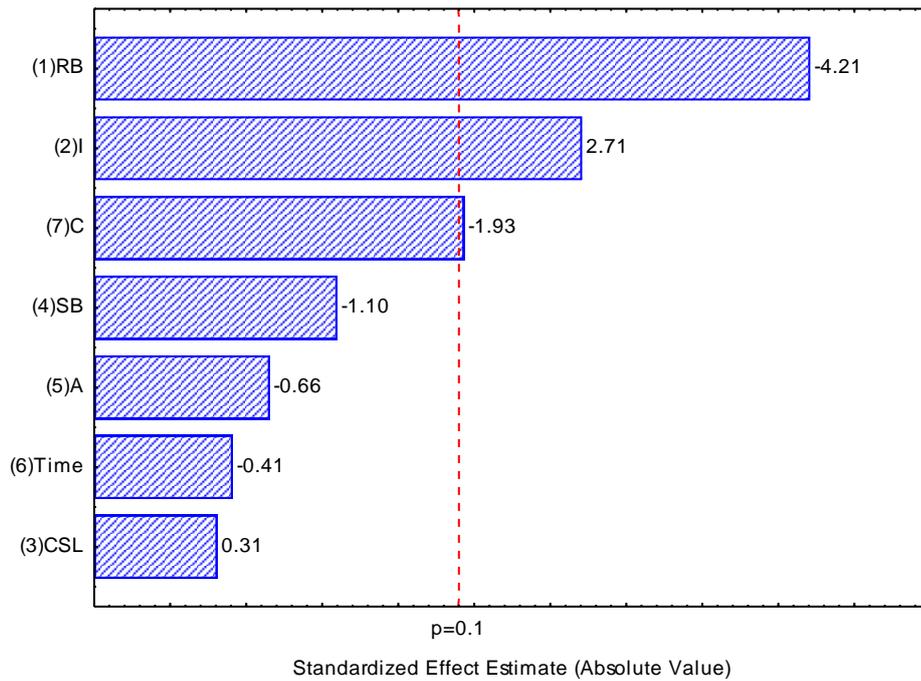
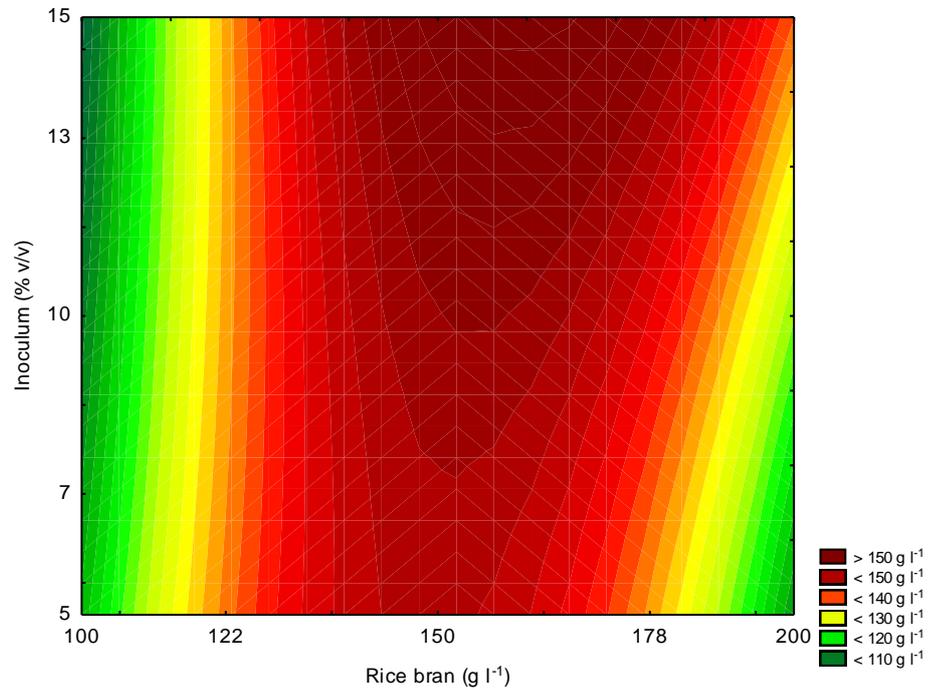
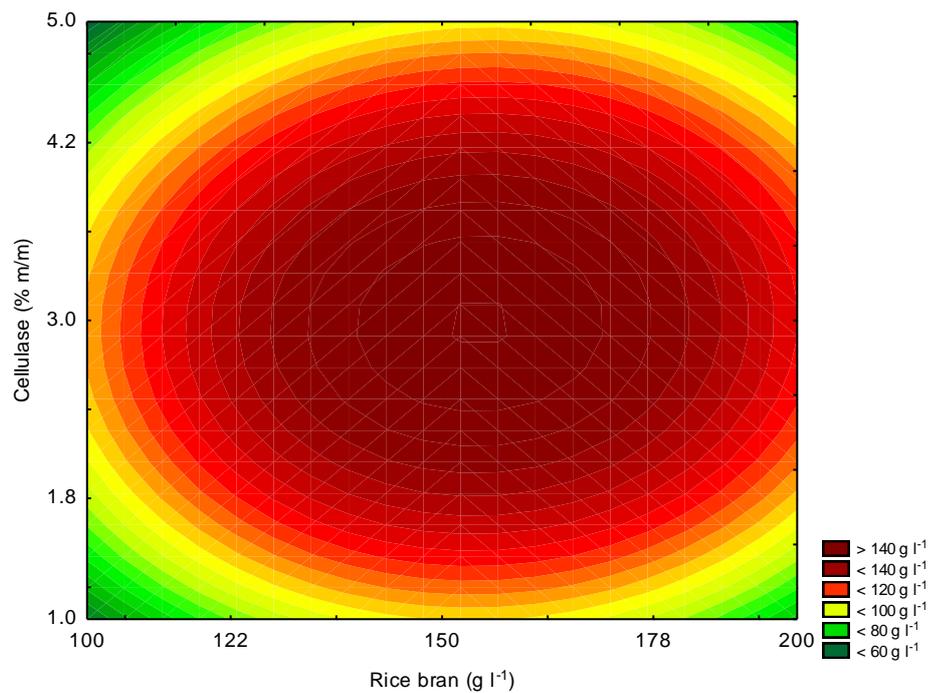


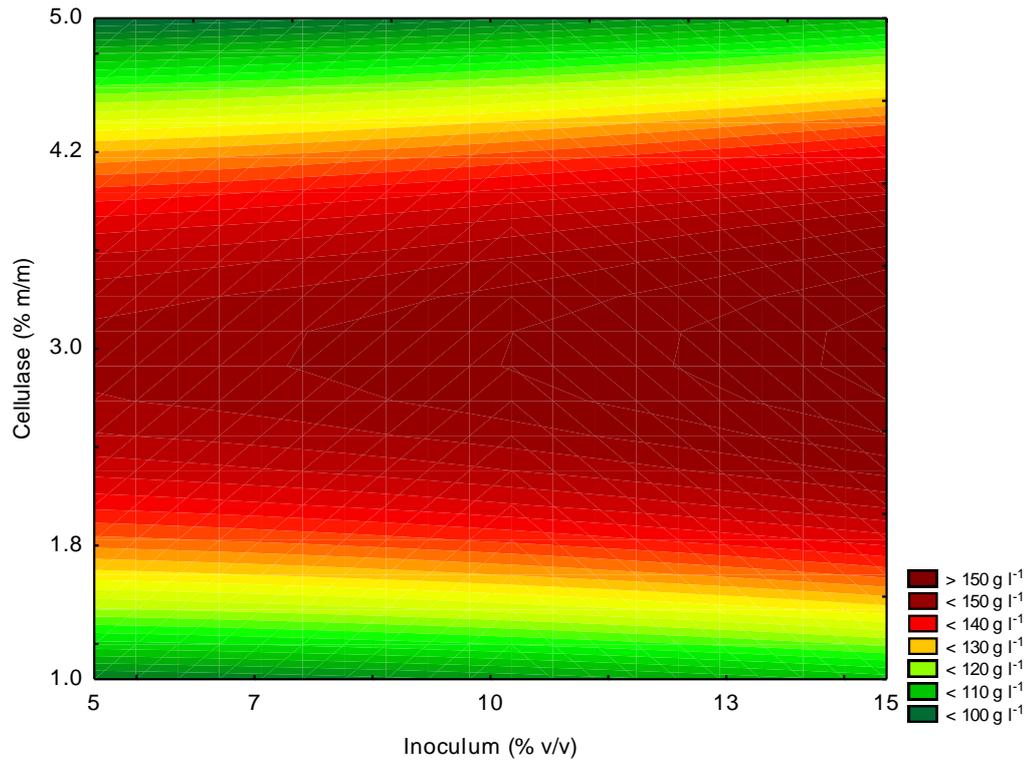
Figure 2– Contour plots showing the influence of process variables on ethanol production: a) inoculum density and rice bran concentration; b) cellulase and rice bran concentrations; and c) cellulase concentration and inoculums density. Third variable was maintained at the central point.



(a)



(b)



(c)

**4 ARTIGO 2 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO O FARELO DE ARROZ COMO MATÉRIA PRIMA**

**INFLUENCE OF TEMPERATURE AND STIRRING RATE IN ETHANOL PRODUCTION USING RICE BRAN AS RAW MATERIAL**

Raul J. Santos Michel Jr., Jessica de Moura Lima , Vitória S. Porto, Marcio A. Mazutti\*

Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, Brazil

Ciência Rural



**Influência das variáveis temperatura e agitação na produção de etanol utilizando o farelo de arroz como matéria prima**

Journal:	<i>Ciência Rural</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	Fermentação, Hidrólise, Processo biotecnológico

SCHOLARONE™  
Manuscripts

---

\*Corresponding author: mazutti@ufsm.br (M. A. Mazutti); Tel.: +55-55-3220-9592

#### 4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o aumento de escala do processo de produção de etanol a partir de farelo de arroz. Para esta finalidade, foi estudado o efeito das variáveis agitação e temperatura na produção de etanol em biorreator com volume útil de 3L. A máxima produção de etanol foi 182,52 g/kg na condição em que a agitação foi 140,5 rpm e a temperatura 35,8°C. Nesta condição, a conversão do amido em etanol foi de 89% e a produção similar àquela obtida em frascos agitados. Dessa forma, foi possível manter a produção mesmo quando o processo foi escalonado em 30 vezes.

**Palavras-chave:** Fermentação, hidrólise, processo biotecnológico

#### 4.2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the scale-up of ethanol production using rice bran as raw material. For this purpose, the effect of the agitation and temperature on ethanol production in bioreactor with a useful volume of 3L was studied. The maximum ethanol yield was 182.52 g / kg in the condition where the stirring rate was 140.5 rpm and the temperature 35.8 ° C. In this condition, the conversion of the starch into ethanol was 89% and the production similar to that obtained in shaken flasks. In this way, it was possible to maintain production even when the process was increased 30 times.

**Key words:** fermentation; hydrolysis; biotechnological process.

### 4.3 INTRODUÇÃO

A atual economia mundial é altamente dependente de várias fontes de energia fósseis, como petróleo, carvão, gás natural, etc. sendo utilizadas para a produção de combustível, eletricidade e outros bens (UIHLEIN et al., 2009). O consumo excessivo de combustíveis fósseis, especialmente nos grandes centros urbanos, resultou na geração de elevados níveis de poluição durante as últimas décadas. O nível de gases de efeito estufa na atmosfera da terra tem aumentado drasticamente (BALLESTEROS et al. 2006). Com a expansão da população humana e o crescente avanço industrial mundial o consumo de energia também aumentou gradualmente.

Neste cenário, outras fontes de energias podem servir como uma alternativa. Atualmente, o bioetanol é considerado uma das fontes energéticas renováveis e com baixa emissão de carbono, tornando-se uma promissora alternativa para substituição ao petróleo, e sua produção tem sido promovida por muitos países (BOTHAST, 2005; LIN, 2006). A produção global de biocombustíveis cresceu de 16 milhões de m<sup>3</sup> em 2000 para mais de 100 milhões de m<sup>3</sup> em 2010 e hoje, os biocombustíveis oferecem cerca de 3% do total de combustível de transporte rodoviário a nível mundial com ações de implementação consideravelmente mais altos alcançados em alguns países. Os EUA e o Brasil são responsáveis por 87,1% dessa produção a partir do milho e da cana de açúcar como matéria-prima, respectivamente, (IYE, 2013). A produção de biocombustíveis de primeira geração, como o etanol de cana de açúcar no Brasil e etanol de milho nos EUA é caracterizado por mercados comerciais maduros e com domínio total da tecnologia, com pouco ou nenhum espaço para melhoria de processos.

A maior parte do bioetanol é produzida a partir de matérias-primas oriundas da cana de açúcar, milho, trigo e cevada. No entanto, o uso destas culturas para produzir bioetanol compete com áreas agrícolas que tem a sua utilização como uma fonte de alimento. Esta

competição teve um grande impacto mundial nos preços de alimentos e rações (SHINOZAKI; KITAMATO, 2010). Além disso, a conversão de florestas e pastagens em novas áreas agricultáveis para suprir a demanda de alimentos também tem sido problemática, pois tal mudança no uso da terra aumenta as emissões de gases de efeito estufa (Searchinger, et.al 2008).

O presente estudo focará especialmente os resíduos provenientes da agroindústria arrozeira. O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial (WALTER et al. 2008). O Brasil é o nono maior produto mundial e colheu 11,26 milhões de toneladas na safra 2009/2010. A produção está distribuída nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso. O cultivo de arroz irrigado, praticado na região Sul do Brasil contribui, em média, com 54% da produção nacional, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro. As projeções de produção e consumo de arroz, avaliadas pela Assessoria de Gestão Estratégica do Mapa, mostram que o Brasil vai colher 14,12 milhões de toneladas de arroz na safra 2019/2020.

A cadeia produtiva do arroz ainda enfrenta vários problemas, ainda que seja extremamente tecnificada, em especial no que diz respeito ao grande volume de resíduos gerados pelo seu beneficiamento, que apresentam difícil manejo e/ou baixo valor comercial, sendo que destes, apenas 10% podem ser adicionados ao produto final. Após a distribuição dos grãos quebrados adicionados ao produto final, 4% de grãos são geralmente destinados a indústria cervejeira e para alimentação animal (LIMBERGER et al., 2008; SILVA et al., 2006). No processo de beneficiamento do arroz, o farelo de arroz se destaca como importante subproduto, o qual segundo o Instituto Rio-grandense do Arroz vem sendo subaproveitado no montante de mais de um milhão de toneladas/ano (CHAUD et.al. 2009).

Em trabalho prévio foi investigada a produção de etanol em frascos agitados, usando farelo de arroz como substrato (MICHEL JR. et al., 2015). Diversas variáveis que afetam o processo foram estudadas e otimizadas, possibilitando a obtenção de  $175 \pm 5.8 \text{ g.kg}^{-1}$ . Com base nestes resultados, o objetivo deste trabalho foi aumentar a escala de produção de etanol, a partir da condução dos experimentos em um biorreator de bancada com capacidade para 5 L visando reproduzir os resultados obtidos nos frascos agitados. Para esta finalidade, um delineamento composto central rotacional foi proposto para estudar o efeito da agitação e da temperatura na hidrólise enzimática e conversão simultânea da glicose em etanol.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.4.1 Materiais

As enzimas utilizadas neste estudo foram complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* NS50013 (Novozymes Latin American) e um complexo amilolítico STARGENT™ 001 e 002 (Genencor, Brazil). O farelo de arroz foi obtido em um moinho de Santa Maria. A composição detalhada do farelo pode ser obtida no trabalho de Michel Jr. et al. (2015).

##### 4.4.2 Microrganismo e inóculo

Foi utilizada a levedura desidratada *Saccharomyces cerevisiae* (Fleishmann). A produção de células para o pré-inóculo foi realizada em frascos de *Erlenmeyer* com 100 mL de meio contendo ( $\text{g l}^{-1}$ ): sacarose (20,0), extrato de levedura (5,0),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (5,0),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,5),  $\text{KCl}$  (1,15) and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,65), pH 6.5. O meio foi inoculado com 1 g de leveduras desidratadas a 30°C e 150 rpm durante 24 h.

##### 4.4.3 Procedimento experimental para sacarificação enzimática e fermentação

As fermentações foram conduzidas em um biorreator de 5L, com volume útil de 3L. As concentrações de inóculo, farelo de arroz, celulase e amilase foram de 15% (v/v), 150 g.L<sup>-1</sup>, 3% (m/m) e 1% (m/m), respectivamente (MICHEL JR. et al., 2015). Inicialmente, farelo de arroz e as enzimas foram adicionadas ao meio reacional, com a reação sendo conduzida por 19 horas. Após este período, foi adicionado o inóculo e o processo acompanhado até 48 h.

Após a fermentação, o meio foi centrifugado a 4 C, 15000 rpm durante 15 minutos para a separação de sólidos e uma alíquota de 1 ml de sobrenadante foi utilizado para determinar a quantidade de açúcares fermentáveis pelo método DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico) (Miller, 1959). Outra alíquota de 5 ml do sobrenadante foi usada para determinação do conteúdo de etanol contida usando um Alcoômetro (Alcolyzer Wine M/WE – Wine Analysis System - Anton Paar, Ashland, USA). Os resultados obtidos foram expressos em g [etanol] por kg [substrato seco].

As variáveis estudadas neste trabalho foram a agitação e temperatura através de um delineamento composto central (DCCR) para duas variáveis independentes. A faixa de temperatura avaliada foi de 30-70°C (compreendendo as faixas ótimas para o crescimento microbiano e para a ação das enzimas) e agitação na faixa de 100-300 rpm. Todos os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considerando um nível de significância de 95% para o DCCR.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a produção de etanol e a eficiência de conversão do amido obtidos nos 11 experimentos do DCCR. Houve uma variação na produção de etanol na faixa entre 33,66 até 182,52 g/kg (experimento 1), enquanto que a conversão variou de 16-89%. Os dados da Tabela 1 foram usados para o cálculo dos efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes e o resultado está expresso na Figura 1.

Como pode ser visto, a única variável que apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) foi a temperatura, a qual apresentou influência negativa na produção de etanol. Em média, o aumento da temperatura do nível -1 (35,8°C) para +1 (64,2°C) resultou em uma redução de 107 g/kg na produção. Este resultado demonstra claramente que altas temperaturas são deletérias para o microrganismo. Alguns autores sugerem que a temperatura ótima para a levedura é em torno de 36°C (ÖHGREN *et al.*, 2007).

As temperaturas elevadas favorecem a reação de hidrólise enzimática, pois as enzimas utilizadas apresentam temperaturas ótimas de ação na faixa de 50-60°C. Porém a levedura não suporta tais temperaturas. Em temperaturas mais baixas, mesmo com uma considerável redução na taxa das reações enzimáticas, foi possível obter produção similar àquela obtida em frascos agitados. A agitação, independente do valor usado, não influenciou na produção de etanol, o que indica que o grau de mistura da solução foi eficiente, possibilitando uma boa interação entre as fases envolvidas. É importante salientar que o uso de farelo de arroz requer o uso de um sistema de mistura para evitar a precipitação da matéria prima, o que resultaria na redução da conversão devido às limitações de transferência de massa.

#### 4.6 CONCLUSÕES

Neste estudo foi avaliado a produção de etanol a partir de farelo de arroz em um biorreator com capacidade de 3L. A máxima produção de etanol foi de 182,52 g/kg, nas condições de 140,5 rpm e 35,8°C. O valor obtido neste trabalho é similar àquele reportado previamente o processo conduzido em frascos agitados. Dessa forma, foi possível manter a produção mesmo quando o processo foi escalonado em 30 vezes.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

BALLESTEROS, I. *et al.* Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 130, p. 496 e 508, 2006.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária (MAPA). **Arroz**. Brasília 2014. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>>. Acesso em jun. 2014.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. **Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos**. Lorena – SP: Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena – USP, 2009.

IYE, E.; BILSBORROW, P. Cellulosic ethanol production from agricultural residues in Nigeria. **Energy Policy**, n. 63, p. 207–214, 2013.

LIMBERGER, V. M. *et al.* Modificação química e física do amido de quirera de arroz para aproveitamento na indústria de alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n.1, p. 84-88, 2008.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 2006.

MILLER, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; LESNICKI, G.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreatment corn stover. **Process Biochem.** 2007. 42, 834–839.

SANTOS, M. R. J. ; CANABARRO, N. I.; ALÉSIO, C.; MALESKI, T.; LABER, T.; SFALCIN, P.; FOLETTO, E. L.; MAYER, F. D.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Enzymatic saccharification and fermentation of Rice processing residue for ethanol production at constant temperature. **Biosystems Engineering**, n. 142, p. 110-116, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemaeng.2015.12.013>.

SEARCHINGER, T. *et al.* Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science** 2008).

SHINOZAKI, Y.; KITAMOTO, H. K. Ethanol production from ensiled rice straw and whole-crop silage by the simultaneous enzymatic saccharification and fermentation process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2010.

SILVA, G. O. et al. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 188-197, 2006.

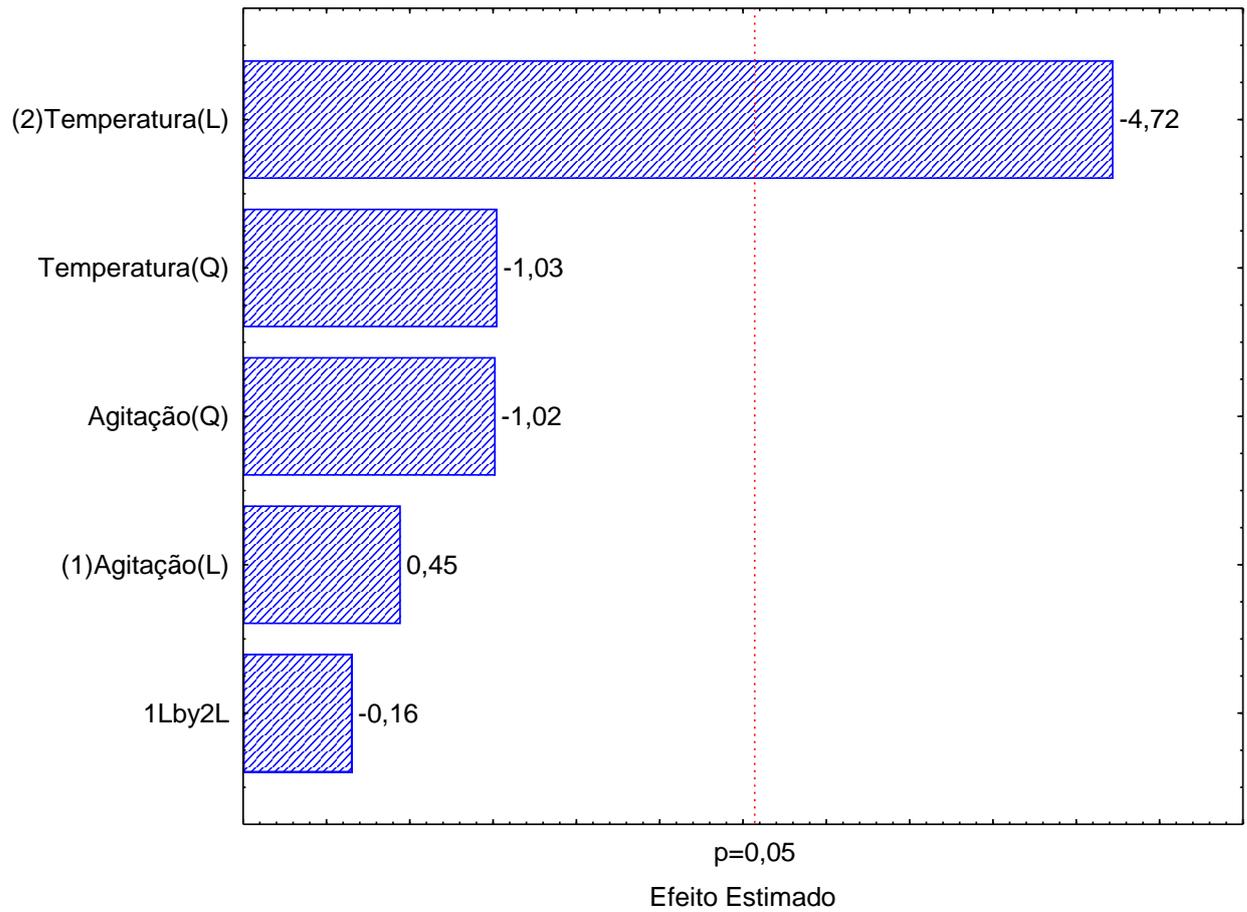
UIHLEIN A.; SCHBEK L. Environmental impacts of a lignocellulosic feedstock biorefinery system: an assessment. **Biomass and Bioenergy**, n. 33, p. 793 e 802, 2009.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.1184-1192, jul, 2008.

Tabela 1- Matriz experimental contendo os resultados referentes à produção de etanol e a eficiência de conversão do amido ao final do processo fermentativo

<b>Exp</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Etanol (g/kg)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<b>1</b>	-1(140,5)	-1(35,8)	182,52	89
<b>2</b>	1(259,5)	-1(35,8)	179,89	87
<b>3</b>	-1(140,5)	1(64,2)	46,29	22
<b>4</b>	1(259,5)	1(64,2)	33,66	16
<b>5</b>	-1,41(100)	0(50)	62,07	30
<b>6</b>	1,41(300)	0(50)	101,52	50
<b>7</b>	0(200)	-1,41(30)	132,55	65
<b>8</b>	0(200)	1,41(70)	30,47	44
<b>9</b>	0(200)	0(50)	124,69	62
<b>10</b>	0(200)	0(50)	108,88	53
<b>11</b>	0(200)	0(50)	137,81	67

Fonte: Autores



**Figura 1.** Gráfico de pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes na produção de etanol

Fonte: Autores

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

O estudo inicial do trabalho apresenta o uso do planejamento Placket-Burman que selecionou as principais variáveis para análise. Outra metodologia utilizada foi o delineamento composto central rotacional (DCCR), levando às conclusões sobre os pontos ótimos de conversão da matéria-prima e suas interações com o inóculo e celulase, em que os valores são otimizados.

A hidrólise enzimática do resíduo gerado no beneficiamento originando o farelo de arroz é uma metodologia simples e eficiente na geração de açúcares redutores, possibilitando o aproveitamento deste resíduo sólido na produção de etanol. Foram obtidas quantidades consideráveis de AR comparativamente com outras fontes amiláceas.

O bom rendimento de etanol proporcionado nas fermentações em *coldhydrolysis* se dá pelo fato de que a hidrólise e a sacarificação ocorrem simultaneamente à medida que vai sendo convertido o amido em açúcar, o açúcar é convertido em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse processo, também pode-se destacar a economia energética, visto que a hidrólise e a sacarificação são realizadas simultaneamente sem a elevação da temperatura para o processo de gelatinização, que ocorre nos outros processos, para obtenção de açúcares fermentáveis. No quadro 1 seguinte é possível analisar as comparações realizadas para os dois experimentos conduzidos em frascos agitados e biorreator de 3 litros.

Quadro 1

Variável	Experimentos	
	Frascos Agitados	Biorreator 3 L
Produção de Etanol (g etanol por quilograma farelo de Arroz)	172,70	182,52
Eficiência (%)	84	89
Resíduo de açúcar no processo (g/L)	3,16	0,53
Percentual de etanol no experimento (%)	3,26	3,46

A partir desses valores alcançados de etanol nos experimentos, pode-se estimar o potencial de produção de etanol a partir deste resíduo que pode chegar a 4% do peso do arroz e, com base na produção anual de 13.140.000T deste cereal no Brasil, e com uma quantidade de resíduo de farelo de arroz estimada em 1 milhão de toneladas que está sendo subaproveitada, existe um grande potencial de produção, de 35 a 50 milhões de litros por ano de etanol.

Com isto, o presente estudo mostra-se uma alternativa viável tecnicamente de produção de etanol, além de servir como iniciativa de gestão ambiental em busca de metodologias para produção mais limpa e equilibrada, visando diminuir os impactos ambientais de resíduos agrícolas gerados em seu processamento, aspectos relativos aos custos devem ser levantados em outros estudos mais específicos, os quais não são objetos deste trabalho.

## 6 ETAPAS FUTURAS

Para dar continuidade ao estudo dos processos de hidrólise e sacarificação simultâneas (SSF) do amido granular reproduzidos em escala de laboratório envolvendo a utilização da matéria-prima farelo de arroz, sugerimos que sejam testados os mesmos fatores em relação ao aumento de escala (*Scale-up*).

Com base nos resultados obtidos na primeira etapa do trabalho, em que foi otimizada a produção em frascos agitados, e na etapa seguinte que consistiu em pesquisas conduzidas em biorreatores de 3 litros as variáveis abordadas sirvam como parâmetros para dados futuros.

Espera-se que com esses dados os processos conduzidos em grande escala possam ser efetivados sem que ocorram problemas, visto que o aumento de escala sempre proporciona situações muitas vezes não estudadas em nível de laboratório ou que envolvem variáveis não consideradas em pequena escala. Na última etapa do estudo sugerimos o estudo e uma avaliação com biorreator de 400 litros para estudo dos aspectos abordados anteriormente. Outro fator relevante em estudos futuros refere-se à avaliação da viabilidade econômica para o uso deste resíduo na produção de etanol visto que uma grande quantidade é subaproveitada segundo ficou demonstrado na revisão da literatura.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ J, Lopez G.; AMUTIO, M. et al. Bio-oil production from rice husk fast pyrolysis in a conical spouted bed reactor. **Fuel**, n. 128, p. 162–169, 2014. doi: 10.1016/j.
- AGRAWAL, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Prog Energy Combustion Sci**, n. 33, p. 233 e 71, 2007.
- AI, Yongfeng; MEDIC, Jelena; JIANG, Hongxin; WANG, Donghai; JANE, Jay-Lin. Starch characterization and ethanol production of sorghum. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, n. 59, p. 7385-7392, 2011.
- AMARASINGHE, B. M. W. P. K.; KUMARASIRI, M. P. M.; GANGODAVILAGE, N.C. Effect of method of stabilization on aqueous extraction of rice bran oil. **Food and bioproducts processing**, n. 87, p. 108–114, 2009. doi: 10.1016/j.fbp.2008.08.002
- ANANDA, N.; VADLANI, P.V.; MADL, R.L. Rice Bran is an effective substitute for yeast extract in ethanol fermentation. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, n. 5, p. 70–74. 2011.
- APINAN, S.; YUJIRO, I.; HIDEFUMI, Y.; TAKESHI, F.; MYLLARINEN, P.; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Visual observation of hydrolyzed potato starch granules by  $\alpha$ -amylase with confocal laser scanning microscopy. **Starch - Starke**, v. 59, n.11, p.543-548. 2007.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. v. 3.
- BALAT, M. An overview of biofuels and policies in the European Union. Energy sources, Part B: Economics, **Planning and Policy**, v. 2, n. 2, p. 167–181, 2007.
- BALAT, M.; BALAT, H; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Turkey, v. 34, p. 551-573, 2008.
- BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; CABANAS, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 130, p. 496 e 508. 2006.
- BALLS, A. K. e SCHWIMMER, S. Digestion of raw starch. **J. Biol. Chem**, v.156, p.203-210, jul, 1944.
- BANKS, G.T., Scale up of fermentation processes. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, p. 170-266, 1984.
- BARROS, M. C.; NASCIMENTO, S. R.; RAMADA, M. H. S.; GALDINO, A. S.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G.; ULHOA, C. J. The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1,  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **Carbohydrate Research**, v.344, n.13, p.1682-1686. 2009.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias, **BNDS Setorial**, v. 25, n. 3, p. 5-38. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Arroz**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

BELL, Timothy A. Challenges in the scale-up of particulate processes: an industrial perspective. **Powder Technology**, n. 150, p. 60–71. 2005.

BENINCA, C. **Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BHELLA, R. S.; ALTOSAAR, I. Purification and some properties of the extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus awamori*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.149-153. 1985.

BHOSALE, P.; JOGDAND, V. V.; GRADE, R. V.; Stability of  $\beta$ -carotene in spray dried preparation of *Rhodotorulaglutinismutant* 32. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 584-590, 2003.

BIAZUS, J.P.M. et al. Optimization of drying of Zea mays malt to use as alternative source of amyolytics enzymes. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. especial, p.185-190, 2005.

BLAZEK, J.; GILBERT, E. P. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. **Biomacromolecules**, v.11, n.12, p.3275-3289. 2010.

BOBIO, F.O.; BOBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela 1995.

BON, ELBA P. S; FERRARA, MARIA A; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ:CAPES: FAPERJ: FCT [Portugual], 2008.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A.: Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Abastecimento e Pecuária> - Brasília 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>>. Acesso em: jun. 2014.

BRINGHENTI, L. **Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2004.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C., Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Revista Energia na Agricultura**, UNESP, Botucatu-SP, v. 20, n.4, p. 36-52, 2005.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo e hidrolisado enriquecido com melão de cana. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, mar./abr. 2007.

BULEON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, n.2, p.85-112. 1998.

CAMPBELL, C. H.; LAHERRERE, J. H. The end of cheap oil. **Scientific American**. n. 78, p. 83,1998.

CARDONA, Carlos A; SÁNCHEZ, Óscar J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **BioresourseTechnology**, n. 98,p. 2415-2457. 2007.

CARDOSO, Maria das Graças; CAMPOS, Gustavo Azevedo et al. **Cachaça: qualidade e produção**. 2007. Disponível em: <[http://www.editora.ufla.br/BolExtensão/pdfBE/bol\\_07.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolExtensão/pdfBE/bol_07.pdf)>. Acesso em: 29 set.2016.

CARVALHO, J. L. V.; BASSINELLO, P. Z. Aproveitamento industrial. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. Cap. 24. p. 1007-1042.

EREDA, M.P.; VILPOUX, O. F. ; VEIGA, P. Possíveis usos da fécula de mandioca e critérios de qualidade. **Boletim Técnico CERAT** – Centro de Raízes Tropicais da UNESP, Botucatu, 1994.

CEREDA, M.P.; CHUZEL, G.C.; VILPOUX, O.; NUNES, O.L.G.da S. Biotecnologia industrial. In: \_\_\_\_\_. **Modificação de fécula por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher. 2001. p.413-460.

CERQUEIRA, P.S.; MACEDO, J.L.S. Atual panorama da agricultura da microrregião de Paulo Afonso – BA e as perspectivas para os biocombustíveis. I Seminário de Sustentabilidade, Desenvolvimento Regional e Recursos Naturais. **Anais...** 2012. p. 41-50.

CHAUD, Luciana Cristina Silveira; ARRUDA, Priscila Vaz; FELIPE, Maria das Graças de Almeida. **Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos**. Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena – USP Lorena – SP, 2009.

CHEN, Guo; ZHANG, Bim. Hydrolysis of granular corn starch with controlled pore size. **Journal of Cereal Science**, n. 56, p. 316-320. 2012.

CHENG-YU, Ho; JUI-JEN, Chang; SHIH-CHI, Lee; TSU-YUAN, Chin; MING-CHE, Shih; WEN-HSIUNG, Li; CHIEH-CHEN, Huang. **Development of cellulosic ethanol production process via co-culturing of artificial cellulosomal Bacillus and kefir yeast**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.016>

CIRELLI, Bernardo Alves. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea a hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2012/2013: nono levantamento - junho/2013**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_06\\_06\\_09\\_09\\_27\\_boletim\\_graos\\_-\\_junho\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_06_06_09_09_27_boletim_graos_-_junho_2013.pdf)>. Acesso em: 02jan.2014.
- COPERSUCAR. **Fermentação**. São Paulo: Centro de Tecnologia Copersucar, v. 1, cap. 10, p. 311-388. 1987.
- CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S. D.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, p.268-273. 2005.
- CRISPIM, Jack Eliseu et al. **Tipos de leveduras e qualidade da cachaça**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). 2004.
- CROUGHAN, M.S.; HAMEL, J.; WANG, D. I. C. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. **BiotechnolBioeng**, n. 29, p. 130–141. 1987.
- CUEVAS, M.; SANCHEZ, S.; GARCÍA, J. F.; BAEZA, J.; PARRA, C.; FREER, J. Enhanced ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated olive stones. **Renew Ener**, n. 74, p. 839-847, 2015. doi: 10.1016/j.
- DEMIRBAS A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, n. 27, p. 327 e 33, 2005.
- DEVANTIER, R.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash: effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and east strain. **ApplMicrobiolBiotechnol**, n. 68, p. 622–629. 2005.
- DIAZ, A. F. Acevedo. **Scale-up strategy for bioreactors with Newtonian and non-Newtonian broths** *Bioprocess Engineering* 21 ± 23 Ó Springer-Verlag, 1999.
- DURAND, A.; PICHOL, P.; DESGRANGES, C.. Approaches to K, a measurements in solid state fermentations. **Biotechnol.Techniques**, n. 2, p. 11-16.1988.
- ELIASSON, A.C. **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker, 1996.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistemas de produção**. 2004. Disponível em: <<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonhtml/arroz>>. Acesso em: jun. 2014.
- \_\_\_\_\_. **Meio ambiente**. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php?id=232&func=pesq>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YANEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: environment, technology and food security. **Renew Sustain Energy Rev**, n. 13, p. 1275e87, 2009.

EUROPARL. **Diretiva relativa à qualidade do combustível**: 2009/28/CE e 2009/30/CE. Disponível em: <[http://www.europarl.europa.eu/atyourservice/pt/displayFtu.html?ftuId=FTU\\_5.7.4.html](http://www.europarl.europa.eu/atyourservice/pt/displayFtu.html?ftuId=FTU_5.7.4.html)>. Acesso em: 30 set.2016.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Union**, Brussels, May 8; 2003

EXPASY. **ProtParam tool**: SIB Bioinformatics Resource Portal Swiss Institute of Bioinformatics. 2012. Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 06 jan.2014.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**: princípios e práticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERREIRA, S.; DURATE, A.P.; RIBEIRO, M.H.L.; QUEIROZ, J.A.; DOMINGUES, F.C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, n. 45, p. 192 e 200. 2009.

FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F. Factors that affect the enzymatic degradation of natural starch granules: effect of the size of the granules. **Starch/Starke**, v. 44, n. 11, p. 422-426, 1992.

FREEMAN, D.W. **Use of by-product and nontraditional feeds for horses**. 2006. Disponível em: <<http://osuextra.okstate.edu/pdfs/F-3923web.pdf>>. Acesso em: 10 ago.2014.

GALLANT, J.D.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. **Microscopy of starch**: evidence of a new level of granule organization. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 1996.

GALVEZ, A. Analysing cold enzyme starch hydrolysis technology in new ethanol plant design. **Ethanol Producer Magazine**, v.11, p.58-60. 2005.

GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, n.1, p.1-11. 1997.

GNANSOUNOU, E.; BEDNIAGUINE, D.; DAURIAT, A. Promoting bioethanol production through clean development mechanism: findings and lessons learnt from ASIATIC project. 7th IAEE European Energy Conference. **Proceedings...** Bergen, Norway, aug. 2005.

GULLISON, R. E.; FRUMHOFF, P. C.; CANADELL, J.G.; FIELD, C. B.; NEPSTAD, D. C.; HAYHOE, K. et al. Tropical forests and climate policy. **Science**, n. 316, p. 985 e 6, 2007.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, n.11, p.1599-1616, 2003.

HENSON, M. A. Biochemical reactor modeling and control. **IEEE Control System Magazine**, v. 26, n. 4, p. 54–62. 2006.

HESELTIME, C.W., Solid state fermentation: part I. **Process Biochem.**,n. 12, p. 24-7, 1977.

HILL, G. A.; ROBINSON, C. W. A modified ghose model for batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* at high ethanol concentrations. **The Chemical Engineering Journal**, v.44, n.3, p. B69- B80. 1990.

HIZUKURI, S. Starch: analytical aspects. In: ELIASSON, A. C. **Carbohydrates in food**. Marcel Dekker, New York, 1996. pp. 347- 429.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tubers and roots starches: a review. **Carbohydrate Polymer, Barking**, v.45. p.253-267. 2002.

HUMPHREY, A. Shake flask to fermentor: What have we learned? *BiotechnolProg* 14:3–7.**Iberoamericanos**, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.

IYE, Edward; BIL SBORROW,Paul. Cellulosic ethanol production from agricultural residues in Nigeria. **Energy Policy**, n. 63, p. 207–214, 2013.

JAROSLAV, Blazek; GILBER, Elliot Paul. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure bragg. Institute, Australian Nuclear Science and Technology Organization, Locked Bag 2001, Kirrawee DC, NSW 2232, Australia. **Biomacromolecules**, n. 11, p. 3275–3289. 2010.

JIAMYANGYUEN, S.; SRIJESDARUK, V.; HARPER, W.J. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, n. 27, p. 55–64. 2005.

JULIANO, B. O. Rice starch: production, properties and uses. In: WHISTLER, R.L.; MILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. (Eds.). **Starch: chemistry and technology**. 2. ed. Orlando: Academic Press, 1984. p.507-527.

JUNKER, B.H. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. **J BiosciBioeng**, n. 97, p. 347–364. 2004.

(B) KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization.**Process Biochemistry**, n. 35, p. 539–550. 2000.

KARGI, F.; CURME, J.A. Solid state fermentation of sweet sorghum to ethanol in a rotary-drum fermenter. **Biotechnol. Bioeng.**, n. 27, p. 1122-5, 1985.

KENT, N. L. **Technology of cereals**: with special reference to wheat. Pergamon Press. 2. ed. p. 241-255, 1975.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, **Biomass Bioenergy**, 2004.

KUMAR, P.K.R.; LONSANE, B.K. Batch and fed-batch solid-state fermentations: kinetics of cell growth, hydrolytic enzymes production and gibberellic acid production. **ProcessBiochem**, n. 23, p. 43-7.1988.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos en alimentos regionales Iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.

LAMSAL, B.P., WANG, H.; JOHNSON, L.A. Effect of corn preparation methods on dry-grind ethanol production by granular starch hydrolysis and partitioning of spent beer solids. **BioresourceTechnol**, v. 102, n. 12, p. 6680–6686. 2011.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Avaliação técnico-econômica da produção de etanol de farelo de mandioca utilizando pectinase como enzima complementar. **Energia na Agricultura**, v.13, n.2, p.1-14, 1998.

LEHNINGER A. L.; NELSON D. L.; COX M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 4. ed. Freeman, 2005.

LEWIS M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. Chapman & Hall, 1995.

LI, H.; JIAO, A.; XU, X.; WU, C.; WEI, B.; HU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of broken rice: an enzymatic extrusion liquefaction pretreatment for Chinese rice wine production. **Bioprocess Biosyst Eng**, n. 36, p. 1141–1148, 2013. doi: 10.1007/s00449-012-0868-0.

LIMBERGER, V. M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T.; COMARELA, C. G.; PATIAS, L. D. Modificação química e física do amido de quirera de arroz para aproveitamento na indústria de alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n.1, p. 84-88, 2008.

LIN, Y.; TANAKA, S.: **Ethanol fermentation from biomass resources**: current state  
LONSANE, B.K; CASTANEDA, G. SAUCEDO; RAIMBAULT, M; ROUSSOS, S;  
VINIEGRA, G. GONZALEZ; GHILDYAL, N.P; RAMAKRISHNA, M; KRISHNAIAH.  
Scale-Up Strategies for Solid State Fermentation Systems. **Process Biochemisrry**, p. 27, 259-273. 1992.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **EnzymeMcrob. Technol.**, n. 7, p. 25865.1985.

LOPES, C. H. **Glossário de termos técnicos para a indústria sucroalcooleira**. Piracicaba: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1986.

MARTIN, Carlos; BJÖRN, A; ANDERS, Sjöde; NILS, O. Niverbrnt; LEIF, J.Jönsson. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for thanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007.

MENARDO S, Airoidi G.; CACCIATORE, V.; BALSARI, P. Potential biogas and methane yield of maize stover fractions and evaluation of some possible stover harvest chains. **Biosyst Eng**, n. 129, p. 352–359, 2014. doi: 10.1016/j.biosystemseng.

MICROSCOPY. **Science**, v.273, n.5274, p.488-490, jul.1996.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, n. 31, p. 426–428.1959.

MORRIS, V. J.; GUNNING, A. P.; FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G.; SVENSSON, B. AFM Images of complexes between amylose and aspergillus niger glucoamylase mutants, native and mutant starch binding domains: a model for the action of glucoamylase. **Starch - Starke**, v.57, n.1, p.1-7. 2005.

MUDGETT, R.E., Controlled gas environments in industrial fermentations. **Enzyme Microb. Techno**, n. 3, p. 273-80. 1980.

NAGASAKA, Y.; KUROSAWA, K.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Purification and properties of the raw-starch-digesting glucoamylases from *Corticium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, n.3, p.323-330. 1998.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v.42, n.4, p.443-448. 2009.

NEVES MA, KIMURA T, SHIMIZU N, NAKAJIMA M. State of the art and future trends of bioethanol production, dynamic biochemistry, process biotechnology and molecular biology. **Global Science Books**, p. 1-13. 2007.

NIKOLIC´, S.; MOJOVIC´, L.; RAKIN, M.; PEJIN, D.; PEJIN, J. Ultrasound- assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. **FoodChem**, n.122, p. 216–222. 2010.

NOVOZYMES, **Enzimas e o meio ambiente** .Disponível em: <[http://www\\_novozymes\\_com-images.htm](http://www_novozymes_com-images.htm)>. Acesso em: 20 jun.2011.

OATES, C. G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.11, p.375-382. 1997.

OLDSHUE, J.Y. Current trends in mixer scale-up techniques. IN: ULBRECHET, J.J.; PATTERSON, G.K. **Mixing of liquids by mechanical agitation**. Nova York: Gordon and Breach Science Publisher, 1985.

ONG, M.H.; BLANSHARD, J.M.V. Texture determinants in cooked, parboiled rice I: rice starch amylose and the fine structure of amylopectin. **Journal of Cereal Science**, v.21, p.251-260, 1995.

ONO, K., SHINTANI, K., SHIGETA, S. e OKA, S. Comparative studies of various molecular species in *Aspergillus niger* glucoamylase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.57, n.7, p.1699-1706. 1988.

OOSTERHUIS, N.M.G.; GROESBEEK, N.M.; KOSSEN, N.W.F.; OLIVER, A.P.C.; SCHENK, E.S; Scale-up/down of bioreactors. In Third European Congress on Biotechnology, Munchen. **Verlag Chemse GmbH, Weinheim**, n. 2, p. 277-82. 1984.

ORTIZ, Samara. **Produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais**. 2010. Dissertação ( Mestrado em Engenharia Química). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

PLANCHOT, V.; ROGER, P.; COLONNA, P. Suitability of starch granule porosity for biosynthesis and amylolysis susceptibility. **Starch - Starke**, v.52, n.10, p.333-339. 2000.

PEJIN, J. D.; MOJOVIĆ, L. V.; PEJIN, D. J, et al. Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. **Fuel**, n. 142, p. 58–64, 2014. doi: 10.1016/j.fuel.

POWER, R. F. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. The Alcohol Textbook. (Ed.). **A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**: UK: Nottingham University Press, 2003.

PRAKASH, O.; JAISWAL, N.  $\alpha$ -Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.8, p.2401-2414, 2010.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.309-317. 2004.

RAMPRAKASH, B.; MUTHUKUMAR, K. Comparative study on the production of biohydrogen from rice mill wastewater. **Int J Hydrogen Energy**, n. 39, p. 14613–14621, 2014. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 1996. v. 3.

REUSSER, F.; KOEPEL, H.I.; SAVAGE, G.M. Degeneration of *Streptomyces niveus* with repeated transfers. **Appl. Micro&o**, n. 9, p. 342-5. 1961.

RIAZ, M.; PERVEEN, R.; JAVED, M. R.; NADEEM, H.; RASHID, M. H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, n.5, p.558-564. 2007.

ROBERTSON, G. H.; DOMINIC, W. S.; WONG, L., CHARLES, C.; WAGSCHAL, K.; SMITH, M. R; ORTS, W. J. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. **Agric. Food Chem.** v.54, 353-365. 2006.

ROEHR, T., **The Biotechnology of ethanol: classical and future applications: WILEY-VCH VerlagGmbH.,2001.**

ROUF , S.A.; YOUNG, M. M.; SCHARER , J.M.; DOUGLAS, P.L. Single versus multiple bioreactor scale-up: economy for high-value products. **Biochemical Engineering Journal**, n. 6, p. 25–31. 2000.

RVOO, D.; MUROHV, V.G.; KARIM, M.N.; TENGEDY, R.P. Evaporative temperature &id moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation. **Biotechnol. Techniques**, n. 5, p. 19-24. 1991.

SAMUEL, D. Investigation of ancient egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. **Science**, v.273, n.5274, p.488-490, jul. 1996.

SANTANA, J. C. C. **Recuperação das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$  –amilases em sistema aquoso bifásico PEG/CaCl<sub>2</sub> para uso como biocatalizador de amiláceos. 2005.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v.35, n.7, p.711-715, 2000.

SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 68, p. 425–435. 2005.

SCHMIDELL, W.; LIMA U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2

SCRICHUWONG, S.; SUNARTI T, C.; MISHIMA, T.; ISONO N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources I: contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. **Carbohydr. Polym**, n. 60, p. 529. 2005.

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R. A.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; TUN-HSIANG, Y.: Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science**, 2008.

SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A.; ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v.23, n.2, p.434-440. 2009.

SHINOZAKI, Yukiko; KITAMOTO, Hiroko K, Ethanol production from ensiled rice straw and whole-crop silage by the simultaneous enzymatic saccharification and fermentation process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2010.

SILMAN, R.W. Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. **Biotechnol. Bioeng**, n. 22, p. 41 I-20. 1980.

SILVA, G. O.; TARIZAWA, R. A.; PEDROSO, R. A.; FRANCO, C. M. C. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 188-197, 2006.

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 75, n. 4, p. 487-491, 2006.

SLININGER, P.J.; GORSICHS, W.; LIU Z.L. Culture nutrition and physiology impact the inhibitor tolerance of the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, n.102, p. 778–790. 2009.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SINGH SODHI, N.; SINGH GILL, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, n.2, p.219-231. 2003.

SRIKANTA, S.; JALEEL, S.A.; GHILDYAL, N.P.; LONSANE, B.K. Techno-economic feasibility of ethanol production from fresh cassava tubers in comparison to dry cassava chips. *Die Nahrung*, 36, 253-8. 1992.

STUPIELLO, J. P. Matérias-primas para obtenção do álcool: fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas no solo. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, p. 66- 69, 1978.

SUGANUMA, T.; FUJITA, K.; KITAHARA, K. Some distinguishable properties between acid stable and neutral types of  $\alpha$ -amylases from acid-producing koji. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.104, n.5, p.353-362. 2007.

SURESH, K.; SREE, N. K.; RAO, LV. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresour Technol**, n. 68, p. 301–304. 1999.

TANAKA, T.; HOSHINA, M.; TANABE, S.; SAKAI, K.; OHTSUBO, S.; TANIGUCHI, M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresour Technol**, n. 97, p. 211–217. 2006.

TANG, H.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Structure and functionality of large, medium and small granule starches in normal and waxy barley endosperms. **Carbohydr. Polym.**, v. 49, n. 2, p. 217-224, 2002.

TATSUMI, H.; KATANO, H. Kinetics of the surface hydrolysis of raw starch by glucoamylase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.21, p.8123-8127. 2005.

TESTER, R. F.; QI, X.; KARKALAS, J. Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Sci. Technol.**, v. 130, n. 1-2, p. 39-54. 2003.

TEXTOR, S. D.; HILL, G. A.; MACDONALD, D. G.; DENIS, E. S. Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.76, n.1, p.87-93. 1998.

THAMMARUTWASIK, P.; KOBAYASHI, Y.; UEDA, S. Alcoholic fermentation of sorghum without cooking. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28 n. 7, p. 1122-1125 1986.

- TRILLI, A., Scale-up of fermentation. In *Industrial Microbiology and Biotechnology*, ed. A.L. Demain & N.A. Solomon. **American Society of Microbiology**, Washington, USA, p. 227-307. 1986.
- TYNER, W.E. The US ethanol and biofuels boom: its origins, current status and future prospects. **BioScience**, n. 58, p. 646–653. 2008.
- UEDA, S. Fungal glucoamylases and raw starch digestion. **Trends in Biochemical Sciences**, v.6, n.0, p.89-90. 1981.
- UIHLEIN, A.; SCHBEK, L. Environmental impacts of a lignocellulosic feedstock biorefinery system: an assessment. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 793 e 802. 2009.
- USHIYAMA, K. Large scale culture techniques of plant cells and the secondary metabolite production. Hakkō. **ToKogyo**, n. 46, p.7-11, 1984.
- VANDEPUTTE, G. E. et al. Rice starches. I. Structural aspects provide insight into crystallinity characteristics and gelatinisation behaviour of granular starch. **J. Cereal Sci.**, v. 38, n. 1, p. 43-52, 2003.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J Dairy Sci**, n. 74, p. 3583–3597, 1991. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- VIEIRA, J. A. Revista da Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, v. 4, n. 13. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/revista/revista13/alcooldemandioca.php>>. Acesso em: 15 mai. 2006.
- VIEIRA, N. R. A.; RABELO, R. R. Qualidade tecnológica. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p. 869-900.
- VIDAL, Bernardo C. Jr.; RAUSCH, Kent D.; TUMBLESÓN, Mike E.; SING, Bijaym-kinetics of granular starch hydrolysis in corn dry-grind process. **InterScience**, n. 61, p. 448-456. 2009.
- VOTRUBA, J.; SOBOTKA, M. Physiological similarity and bioreactor scale-up folia. **Microbiol**, v. 37, n. 5, p. 331-345, 1992.
- WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A. de. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.1184-1192, jul. 2008.
- WANG, Xu; JIE, Ding; WAN-QIAN, Guo; NAN-QI Ren. Scale-up and optimization of biohydrogen production reactor from laboratory-scale to industrial-scale on the basis of computational fluid dynamics simulation. **International Journal Of Hydrogen Energy**, n. 35, p. 10960-10966.2010.

- WEBER, Fernanda Hart; COLLARES-QUEIROZ, Fernanda Paula; CHANG, YoonKil. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 748-753, out.-dez. 2009.
- WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. Dekker, 1994.
- WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics and opportunities. **Bioresource Technology**, n. 50, p. 3-16. 1994.
- WYMAN, C. E.; SPINDLER, D. D.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 5, p. 301-307. 1992.
- ZENG, M. et al. Sources of variation for starch gelatinization, pasting, and gelation properties in wheat. **Cereal Chem.**, v. 74, n. 1, p. 63-71, 1997.
- ZHANG, T.; OATES C.G. Relationship between  $\alpha$ -amylase degradation and physicochemical properties of sweet potato starches. **Food Chem.** n. 65, p. 157. 1999.
- ZHAO, R.; BEAN, S. R.; WANG, D.; PARK, S. H.; SCHOBBER, T. J.; WILSON, J. D. Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorghum grain. **J Cereal Sci**, v. 49, n. 2, p. 230e8, 2009.
- ZHOU, Z. et al. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2000.