



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Nicholas Islongo Canabarro

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

Nicholas Islongo Canabarro

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos.**

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti
Coorientador: Prof. Dr. Wagner L. Priamo

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos

A comissão organizadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

elaborada por

Nicholas Islongo Canabarro

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcio Antonio Mazutti, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rosana Goldbeck, Dra. (UNICAMP)

Raquel Kunh, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2015.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Helton da Costa Canabarro e Mara Beatriz Islongo Canabarro, e a minha irmã Mariana Islongo Canabarro, por todo o apoio e compreensão durante esses dois anos.

Agradeço ao Professor Marcio Antonio Mazutti, não só pela orientação, mas sim pela amizade construída durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos, Chayene, Thiago, Camila, Flávio, Paulo, Rodrigo, Juliana, Michel e Daniel por todo apoio e por todos os churrascos, risadas e bobagens. Com certeza vocês serão inesquecíveis e foram de extrema importância no meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a aluna de iniciação científica, Cláudia Alessio, pela amizade e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Professor Sergio Jahn e a Professora Raquel Cristine Kuhn, pela amizade e parceria no Laboratório de Bioprocessos (LABIP).

Agradeço ao restante do corpo docente e aos funcionários do programa de pós graduação em Engenharia de processos.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior) pelo incentivo financeiro e, ao CNPq pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos por toda estrutura física disponibilizada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Autor: Nicholas Islongo Canabarro

Orientador: Marcio Antonio Mazutti

Coorientador: Wagner Luiz Priamo

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 20 de fevereiro de 2015.

A crise energética causada pela exaustão de combustíveis fósseis e problemas ambientais tem causado preocupações de pesquisadores e, conseqüentemente, fazendo com que os mesmos procurem alternativas para substituir os combustíveis fósseis por fontes renováveis. Uma alternativa interessante é o uso da fermentação em estado sólido para produção de biocombustíveis, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de açúcares fermentáveis. No Rio Grande do Sul, cerca de 10 milhões de toneladas de arroz são produzidas por ano no Estado, produzindo em torno de 3 milhões de toneladas de casca de arroz e 1,5 milhão de toneladas de farelo de arroz. Tais resíduos apresentam grande potencial para a produção de bioetanol, porém não há técnicas adequadas até o momento para a produção industrial de etanol através destes resíduos. A técnica de extração de etanol proveniente do processo de fermentação em estado sólido é uma das técnicas que devem ser aprimoradas para que o processo se torne eficiente e ambientalmente correto. Com isso, neste trabalho foi realizada uma etapa preliminar ao processo de produção de etanol por fermentação em estado sólido, avaliando um método de extração de etanol utilizando água destilada como solvente. Nesta etapa, foram avaliados parâmetros que influenciam o processo fermentativo (teor de umidade, e concentração inicial de etanol) e o processo de extração (temperatura, agitação e razão sólido-líquido). Fixadas as condições de extração, a metodologia de planejamento de experimentos foi utilizada com objetivo de identificar as variáveis significativas no processo de fermentação em estado sólido para a produção de etanol, através da aplicação de um design de experimentos Plackett & Burmann. O método de superfície de resposta foi utilizado para realizar a otimização do processo, com base na avaliação de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Por fim, foi proposto um aumento de escala do processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido, atingindo uma concentração de etanol final de 143,88 g EtOH/ kg substrato.

Palavras chave: bioetanol, sacarificação e fermentação simultânea, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Master's thesis
Graduate Program in Process Engineering
Federal University of Santa Maria

BIOETHANOL PRODUCTION FOR LIGNOCELULOSIC BIOMASS BY SOLID STATE FERMENTATION

Author: Nicholas Islongo Canabarro

Advisor: Marcio Antonio Mazutti

Coadvisor: Wagner Luiz Priamo

Date and Local of defense: Santa Maria, February 20th, 2015.

The energy crisis caused by the exhaustion of fossil fuels and environmental problems has caused concerns of researchers and, consequently, causing them to seek alternatives to replace fossil fuels with renewable sources. An interesting alternative is the use of solid-state fermentation for biofuels production using agricultural residues as a source of fermentable sugars. In Rio Grande do Sul, about 10 million tons of rice a year are produced in the state, producing around 3 million tons of rice husk and 1.5 million tons of rice bran. Such wastes have great potential for the production of bioethanol, but there are no proper techniques to date for the industrial production of ethanol by these wastes. The ethanol extraction technique from the solid state fermentation process is techniques should be improved so that the process becomes efficient and environmentally friendly. Thus, in this work was carried out a preliminary step to ethanol production process by solid state fermentation, evaluating an ethanol extraction method using distilled water as solvent. In this step, we evaluated parameters influencing the fermentation process (moisture content and initial concentration of ethanol) and the extraction process (temperature, agitation and solid-liquid ratio). Set the extraction conditions, the experimental design methodology was used in order to identify the significant variables in the process of solid state fermentation for ethanol production through the application of a design Plackett & Burmann experiments. The response surface methodology was used to perform process optimization, based on the evaluation of a central composite rotational design (CCRD). For end a scale-up of the simultaneous saccharification and solid state fermentation process was proposed, reaching a final ethanol concentration of 143.88 g EtOH / kg substrate.

Keywords: bioethanol, simultaneous saccharification and fermentation, solid state fermentation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.4.1 - Composição em base seca de lignocelulose em várias fontes.....	23
Tabela 2.6.1 - Forma de condução de um processo de fermentação submersa e suas principais características.Fonte: Schmidell (2001).	29
Tabela 2.7.1- Grupos e configurações dos biorreatores em estado sólido segundo Mitchell et. al (2006).	33
Tabela 3.1.1 - Diferentes condições de fermentação e extração para a recuperação de etanol. Fonte: Autor (2015)	43
Tabela 3.2.2 - Meio sintético para confecção do inoculo.	46
Tabela 3.2.2 - Parâmetros avaliados e níveis coficados para o PB 16.	49
Tabela 3.2.3 - Parâmetros avaliados e níveis codificados.....	50
Tabela 3.2.4 - Análise da influencia do complexo amilolítico na produção de etanol.	50
Tabela 3.4.1 – Níveis codificados para o DCCR no processo de aumento de escala.	53
Tabela 4.1.1 - Influência da umidade na recuperação de etanol do bagaço de cana de açúcar.54	
Tabela 4.1.2 - Influência da concentração inicial de etanol na recuperação a partir do bagaço de cana de açúcar.....	55
Tabela 4.1.3 - Influência da razão sólido líquido na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.....	56
Tabela 4.1.4 - Influência da temperatura na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.	57
Tabela 4.1.5 - Influência da agitação na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.	58
Tabela 4.2.1 - Matriz do PB16 para avaliar a influência dos parâmetros na produção de etanol.59	
Tabela 4.2.2 - Análise dos efeitos das variáveis independentes do PB16 na produção de etanol. 60	
Tabela4.2.3 - Matriz CCRD e resultados da produção de etanol (g EtOH/kg S).	61
Tabela 4.2.4 - Efeito estimado, coeficiente de regressão e valores de t e p para o CCRD.	62
Tabela 4.2.5 - Análise da influência da enzima Amilase na produção de etanol.	64
Tabela 4.3.1 - Matriz do planejamento DCCR e resultados da produção de etanol para o aumento de escala.	67
Tabela 4.3.2 - Coeficiente de regressão para o delineamento composto central rotacional. ...	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.4.1 - Principais matérias primas lignocelulósicas para a produção de etanol... ..	21
Figura 2.4.2 - Principais constituintes da matéria prima lignocelulósica.	22
Figura 2.4.1 - Ação catalítica das enzimas.	24
Figura 2.4.2 - Ação enzimática em material lignocelulósico.....	25
Figura 2.5.1 - Esquema de produção de etanol de segunda geração através do bagaço de cana de açúcar.....	26
Figura 2.6.1 - Principais etapas da produção de etanol de primeira geração a partir do caldo de cana de açúcar.....	28
Figura 2.7.1 - Esquema das partículas sólidas úmidas e fase gasosa contínua envolvendo um organismo celular.....	30
Figura 2.7.2 - Biorreatores do tipo bandeja.....	34
Figura 2.7.3 - Biorreator do tipo leito fixo.....	35
Figura 3.1.1 - Bagaço de cana de açúcar.....	42
Figura 3.2.1 - Casca e farelo de arroz.....	45
Figura 3.2.3 - Sacarificação e fermentação em estado sólido simultâneo em escala de bancada.....	48
Figura 3.4.1 - Unidade experimental utilizada para o aumento de escala.....	52
Figura 4.2.2 - Superfície de contorno do rendimento de etanol conforme delineamento composto central rotacional.....	63
Figura 4.2.3 - Cinética do processo nas condições ótimas para o processo em escala de bancada.....	65
Figura 4.3.1 - Superfícies de contorno para o aumento de escala na produção de etanol. a) Umidade versus substrato; b) Substrato versus inoculo; c) inoculo versus umidade.	Erro! Indicador não d
Figura 4.3.2 - Cinética do processo nas condições ótimas determinadas para o aumento de escala.....	72

Sumário

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	11
1.1. Objetivos	13
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Uso de biomassa para a produção de etanol.....	15
2.2 Arroz e seus subprodutos	17
2.3 Fontes primárias de açúcares	18
2.4 Fontes secundárias de açúcares	20
2.4.1. Hidrólise	23
2.5. Etanol de Segunda Geração	25
2.6. Fermentação submersa.....	27
2.6.1. Condução de um processo de fermentação submersa	29
2.7. Fermentação em estado sólido	30
2.7.1. Biorreatores para fermentação em estado sólido	32
2.8. Sacarificação e Fermentação Simultânea.....	36
2.9 Extração de Etanol.....	38
2.10. Desafios para aumento de escala em FES.....	39
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Estudo da extração do Etanol	41
3.1.1. Matéria prima e solventes.....	41
3.1.2. Preparo da amostra e extração do etanol	42
3.1.3 Determinação do etanol.....	44
3.2 Estudo da produção de etanol de segunda geração	45
3.2.1 Matéria prima e micro-organismos	45
3.2.2 Preparo e esterilização das amostras	47
3.2.3 Sacarificação e fermentação em estado sólido simultânea.....	48
3.3 Aumento de escala.....	51
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Estudo da extração de etanol.....	54
4.1.1 Influência dos parâmetros de fermentação na recuperação do etanol.....	54
4.1.2Influência dos parâmetros de extração na recuperação de etanol.....	56
4.2 Sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido	58
4.3 Aumento de Escala	67
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	74
5.1 Estudo sobre a extração do etanol	74
5.2 Sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido	75

5.2.1 Escala de bancada	75
5.2.2 Aumento de escala	76
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
APENDICE A	87

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A redução gradual nos recursos para produção de combustíveis fósseis, o aumento nos riscos e preocupações de poluição ambiental e as trocas inesperadas no preço do óleo tem contribuído para que muitos países investiguem novos recursos que sejam renováveis para a demanda energética mundial. Uma alternativa atraente é a produção de etanol combustível através de várias fontes e diferentes processos (FIELD *et al.*, 2008). O uso de etanol como combustível tem uma longa história, iniciando em 1826 quando Samuel Morey testou o primeiro protótipo americano de motor de combustão interna. A renovação do interesse em etanol combustível iniciou, entretanto, a partir da crise mundial do óleo em 1973-74, quando o governo brasileiro lançou seu programa estratégico chamado ProAcool, com fins de substituir uma grande quantidade de óleo importado de outros países. Neste programa, foi escolhida a cana de açúcar como matéria prima para a produção do etanol e, como consequência, intensificaram-se os estudos tecnológicos e agrícolas, levando o Brasil a uma posição favorável em termos de energia obtida a partir da cana. Atualmente, há 448 unidades instaladas para a produção de etanol no Brasil, das quais 354 unidades estão localizadas no sul, sudeste e centro-oeste. De acordo com o Ministério de Minas e Energia, a produção de etanol na safra de 2013/2014 foi de 27 bilhões de litros, dos quais 3 bilhões de litros foram exportados até o mês de maio de 2014. Estimativas apontam um crescimento no aumento do etanol exportado quando comparado com a safra anterior (2012/2013), onde foi exportado um total de 3,5 bilhões de litros de etanol. Porém, na safra 2013/2014 o Estado do Rio Grande do Sul foi responsável pela produção de 5 milhões de litros de etanol, ficando atrás de Estados como São Paulo (13,944 bilhões de litros), Goiás (3,879 bilhões de litros), Minas Gerais (2,657 bilhões de litros), dentre outros (ÚNICA,2015).

O Estado do Rio Grande do Sul, por não ser um grande produtor de cana de açúcar não produz uma quantidade significativa de etanol comparado com o apresentado atualmente no cenário nacional (principalmente região sudeste e nordeste), porém a capacidade de produção de etanol pode aumentar consideravelmente a partir do desenvolvimento da tecnologia de produção a partir da utilização de materiais lignocelulósicos, com especial atenção aos resíduos agroindustriais gerados em quantidades expressivas, como é o caso da casca e do farelo de arroz. A produção anual de arroz no Brasil é de aproximadamente doze milhões de toneladas do cereal, sendo o Rio Grande do Sul responsável por aproximadamente 67% da produção do país

(IBGE,2014). A biomassa lignocelulósica tem sido considerada como a matéria prima ideal para a produção de biocombustíveis, uma vez que não compete com recursos alimentares e pode, potencialmente, reduzir a emissão de dióxido de carbono em até 75% comparado com combustíveis fósseis. Os combustíveis oriundos de biomassa lignocelulósica são chamados de biocombustíveis de segunda geração (2G) (XIN *et al.*, 2013; GALBE *et al.*; 2007).

O Etanol (CH_3CH_2OH) é o biocombustível de maior popularidade que se encontra disponível em praticamente todo mercado mundial. Segundo Henry Ford, o etanol será um combustível para o futuro, lhe atribuindo o termo “*fuel of the future*”. Há várias razões para sua utilização como combustível alternativo, tais como, a produção a partir dos produtos agrícolas renováveis como milho, açúcar, melão, incluindo outros produtos, em vez de produtos petrolíferos não renováveis, é menos tóxico do que outros combustíveis alcoólicos, e derivados de oxidação incompleta de etanol (ácido acético e acetaldeído) são menos tóxicos do que os subprodutos formados a partir de outros alcoóis combustíveis. (MINTEER, 2006)

Comparado com biocombustíveis de primeira geração (1G) produzidos por culturas alimentares, biocombustíveis de segunda geração (2G) obtidos a partir de biomassa lignocelulósica ou resíduos agroindustriais têm muitas vantagens. A maioria dos biocombustíveis de segunda geração é considerada capaz de reduzir substancialmente a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa quando comparados ao petróleo. Entretanto, o desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração ainda é um desafio, com a necessidade de garantia de estabilidade e baixo custo das matérias primas, minimizando as mudanças de uso da terra pela alta demanda de matéria prima e o aperfeiçoamento de tecnologias para a produção de biocombustíveis. (WANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2006; SHEEHAN *et al.*, 2003)

Uma alternativa para a produção de biocombustíveis é a produção de etanol de segunda geração através da fermentação em estado sólido, que consiste em um processo onde o micro-organismo se desenvolve na superfície de materiais sólidos como, por exemplo, resíduos agroindustriais. Neste processo, a composição do material sólido pode ser modificada pela adição de nutrientes e água para melhorar o meio ou para regular o nível de atividade de água durante a fermentação. A fermentação em estado sólido oferece muitas vantagens frente ao processo de fermentação submersa, incluindo a possibilidade de obtenção de um caldo fermentado mais concentrado, uma vez que se podem manipular as condições de recuperação do etanol de maneira a minimizar o uso de água. De maneira direta, tem-se uma diminuição nos

gastos energéticos associados com a destilação, além de uma menor geração de resíduo. Além disso, o uso de meios de cultivo de fácil formulação e meios de produção compreendidos basicamente por resíduos agroindustriais, menor volume de efluentes gerados ao final do processo, simplicidade e habilidade para manipular pequenos volumes, menor gasto energético e fácil separação do produto final são outras vantagens apresentadas do processo de fermentação em estado sólido frente ao processo tradicional de fermentação submersa. (MOSIER; LADISCH, 2009; BENDER *et al.*, 2008)

No entanto, problemas associados à hidrólise da biomassa podem comprometer o processo de fermentação em estado sólido. A concentração de glicose no meio fermentativo é responsável pelo aumento da pressão osmótica do meio e também pela inibição das enzimas responsáveis pelo processo de hidrólise, as celulasas. Uma alternativa frente ao problema abordado é a utilização do processo de sacarificação e fermentação simultâneo para a produção de etanol. Além de evitar erros provenientes da manipulação do processo, tais como a contaminação, o processo de sacarificação e fermentação simultâneo é realizado em um único reator, diminuindo os gastos do processo. A chave do processo de sacarificação e fermentação em estado sólido simultâneo a partir de biomassa é a sua capacidade para rapidamente converter os açúcares em etanol, logo que eles são formados diminuindo a sua acumulação no meio. Tendo em conta que os açúcares são muito mais inibitórios para o processo de conversão do que o etanol, o processo de sacarificação e fermentação simultâneo pode alcançar taxas mais elevadas de concentração de etanol em relação ao processo de hidrólise e fermentação separadas (VINCENT *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2011; BRETHAUER; WYMAN, 2010;)

1.1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o aumento de escala do processo de produção de etanol empregando um processo de sacarificação e fermentação em estado sólido simultâneo através de dois resíduos agroindustriais gerados em quantidades significativas no Brasil que são o farelo e a casca de arroz. Para atender ao objetivo geral, faz-se necessário o cumprimento dos seguintes objetivos específicos:

Capítulo 1– Introdução

- desenvolver uma metodologia para a extração do etanol produzido por fermentação em estado sólido;
- avaliar a produção de etanol a partir da casa e do farelo de arroz através de um processo simultâneo de hidrólise e fermentação em estado sólido;
- avaliar a influência dos parâmetros temperatura, umidade, proporção de substrato (casa e farelo de arroz), porcentagem do inóculo, volume de água de maceração de milho (AMM), concentração de farelo de soja e concentração de enzimas (Celulase e Amilase);
- propor um aumento de escala para o processo utilizando uma unidade reacional contendo um reator de aço inoxidável e um banho termoestático.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Uso de Biomassa para a produção de etanol

Segundo Cardona e Sanchez (2007), etanol pode ser obtido através do processo de fermentação da sacarose ou açúcares simples, que são produzidos a partir de biomassas. O etanol combustível pode ser derivado de fontes renováveis, geralmente plantas ou resíduos agroindustriais, tais como trigo, beterraba, milho, palhas de trigo, cascas de arroz e madeira. É possível que madeira, resíduos agroindustriais e até mesmo efluentes domiciliares sejam convertidos de maneira econômica em etanol combustível.

No Brasil, a produção de etanol combustível é realizada a partir da cana de açúcar, matéria prima que contém um caldo rico em açúcares, excelentes para o processo fermentativo. Países da Europa utilizam a beterraba para a produção de etanol combustível e açúcar e, nos Estados Unidos, o milho é a principal matéria prima para a obtenção desta *commodity* (BOHLMANN, 2006). Além disso, etanol pode ser produzido a partir de outras matérias primas. Material lignocelulósico vem chamando muita atenção da comunidade científica, pois geralmente são resíduos agroindustriais, concatenando para a diminuição do custo de produção e os problemas relacionados à destinação final de tais resíduos. Para tanto, a utilização destas matérias primas requer um pré-tratamento, para que açúcares simples sejam disponibilizados ao micro-organismo e então, sejam convertidos em etanol. (VIIKARI; VEHMAANPERÄ; KOIVULA, 2012; GNANSOUNOU; DAURIAT, 2010).

De uma maneira geral, independentemente da natureza da matéria prima utilizada, etanol combustível é produzido através de carboidratos, mais precisamente de um, a sacarose. A fermentação da sacarose é realizada através de uma levedura comercial, tal como a *Saccharomyces cerevisiae* (SINGH; BISHNOI, 2013; TURHAN *et al.*, 2010). A reação química que envolve o processo é composta por hidrólise enzimática seguida de fermentação. O dissacarídeo mais utilizado para a produção de etanol é a sacarose, composta de glicose e frutose. A sacarose compreende cerca de 48% da produção de etanol em torno de todo o

mundo (LICHT, 2006). A conversão de sacarose em glicose é realizada através da ação da enzima invertase, conforme apresenta a equação 2.1.



Em um segundo momento, a zimase, outra enzima também presente na levedura, realiza a conversão da glicose em etanol e gás carbônico, como se pode observar na Equação 2.2.



Conforme pode ser observado nas equações 2.1 e 2.2, etanol pode ser obtido basicamente através da sacarose (GNANSOUNOU *et al.*, 2005). Este dissacarídeo pode ser obtido através de diferentes biomassas. No caso das matérias primas açucaradas, tais como a cana-de-açúcar e o sorgo sacarino, basta um processo de moagem para obtenção de um caldo rico em glicose, chamado convencionalmente de melaço. Outra possibilidade de obtenção de glicose é através de matérias primas amiláceas e lignocelulósicas. Nesta situação, a matéria prima sofre uma transformação, liberando a glicose para o meio e a deixando livre para a conversão em etanol. A matéria prima lignocelulósica vem chamando atenção atualmente, pois compreende a maioria dos resíduos obtidos na agricultura, tais como palha de trigo, casca de arroz, farelo de arroz, cavacos de madeira, cascas de frutos dentre outros (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). O que difere as três matérias primas é basicamente a sua estrutura morfológica onde, nas matérias primas açucaradas a sacarose se encontra livre para o consumo do micro-organismo e, já nas matérias primas amiláceas e lignocelulósicas se faz necessário um pré-tratamento a fim de disponibilizar a sacarose para o meio fermentativo e conseqüentemente ser metabolizado pelo micro-organismo (GALBE; ZACCH, 2007). Desta forma, as matérias primas açucaradas são responsáveis pela produção do etanol de primeira geração que, conforme o nome representa uma transformação direta da sacarose em etanol combustível. Já a matéria prima lignocelulósica, é responsável pela produção do etanol de segunda geração, onde as mesmas sofrem algum tratamento prévio ao processo fermentativo, transformando a matriz sólida (lignina, celulose, hemicelulose) em sacarose e assim sendo convertida em etanol combustível.(PATRIK *et al.*, 2014)

2.2 Arroz e seus subprodutos

Há décadas o arroz vem sendo uma das culturas de cereais mais importantes do mundo, sendo o alimento básico responsável pela alimentação de cerca da metade da população mundial. Com base em dados obtidos pela FAO (*Food and Agriculture Organization of United Nations*), os nove principais produtores de arroz no mundo são China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Mianmar, Filipinas, Brasil e Japão (YU *et al.*, 2012). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a produção de arroz na safra de 2013/2014 foi em torno dos 13 milhões de toneladas, sendo 11 milhões de toneladas produzidas pelo Estado do Rio Grande do Sul, conforme é relatado pelo Instituto Rio-grandense do Arroz (IRGA). O arroz fornece a nutrição necessária para o povo de países subdesenvolvidos, tendo grande importância na dieta diária da população devido a sua composição e característica nutricional.

O grão de arroz maduro colhido é chamado de arroz em casca, onde a casca que o envolve é dividida em duas folhas modificadas. Através da remoção da casca é obtido o arroz marrom (integral), sendo composto basicamente por tegumento, núcleo, endosperma e embrião. Quando as camadas externas do arroz integral são retiradas através do processo de moagem, é produzido o arroz branco ou arroz polido. Um dos subprodutos durante a moagem é o farelo de arroz, que segundo Juliano (2003), representa de 6 a 11% da massa total de arroz integral. Alguns nutrientes encontrados em todo o grão de arroz são depositados no farelo de arroz, a exemplo do γ -oryzanol, um óleo contido nos poros do farelo de arroz e que possui alto valor agregado no mercado de fármacos e cosméticos. Além do γ -oryzanol o arroz é rico em proteínas, fibras, vitaminas e minerais. Apesar de sua grande capacidade nutricional, o farelo de arroz é principalmente utilizado para alimentação animal ou descartado devido a rancidez causada principalmente pelas lípases (TUNCEL, 2014). O processo tradicional de beneficiamento de arroz apresenta 65 a 75% de grãos polidos (inteiros e quebrados), 19 a 23% de casca, 8 a 12% de farelo e 3 a 5% de impurezas. Sendo assim, cerca de 3 milhões de toneladas de casca de arroz e 1,5 milhão de farelo de arroz são gerados no beneficiamento de arroz a cada safra realizada. (MAGALHÃES; GOMES; SANTOS, 2004)

As preocupações ambientais sobre resíduos agroindustriais inspiraram uma busca por novas metodologias para a produção de energia e tornaram-se um interesse principal da

comunidade científica mundial. Desta forma, Rocha *et al* (2013) desenvolveram um estudo sobre a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais, tais como casca e farelo de arroz, bagaço de cana de açúcar e soro de leite coalhado. A produção de combustíveis por rotas biotecnológicas é uma alternativa aos resíduos agroindustriais que são gerados ao redor do mundo, reduzindo a deposição de resíduos sólidos e amenizando a preocupação a respeito dos combustíveis fósseis devido à escassez do petróleo nas próximas décadas. Resíduos agroindustriais tais como palha de trigo, pó de madeira, farelo e casca de arroz, efluentes municipais, bagaço de cana de açúcar são adequados para o uso como substratos na fermentação alcoólica através da conversão enzimática destes em açúcares fermentescíveis. (MAKI *et al*, 2009.)

2.3 Fontes primárias de açúcares

Segundo Vohra *et al.* (2014), fontes primárias de açúcares são as matérias primas que possuem sacarose na sua composição de maneira livre, não necessitando de nenhum pré-tratamento para transformar sua estrutura inicial em sacarose e assim ser convertido em etanol através da ação de um micro-organismo, geralmente leveduras. Matérias primas que contêm açúcares livres são responsáveis pela produção de etanol de primeira geração, segundo relata Balat (2011). De modo geral, biocombustíveis de primeira geração são aqueles que atualmente têm atingido um estágio de produção industrial. A obtenção de combustíveis de primeira geração, como no caso do etanol, pode ser realizada através da utilização de matérias primas agroindustriais, tais como cana de açúcar no Brasil e o milho nos Estados Unidos (XIN *et al.*, 2013). No processo de conversão de açúcar em etanol, a sacarose é obtida a partir de culturas ricas em açúcar, tais como a cana de açúcar, a beterraba e o sorgo sacarino, sendo posteriormente fermentada através da ação de uma levedura em etanol (SARKAR *et al.*, 2012). As principais vantagens na utilização desta biomassa estão no seu alto rendimento de açúcar por hectare e pelo baixo custo de conversão em etanol. De maneira oposta, a principal desvantagem fica em torno da disponibilidade sazonal que tais culturas possuem, dificultando um processo de produção contínuo. Por outro lado, o milho, um cereal rico em amido, é chamado de biomassa amilácea. Tanto as biomassas ricas em açúcar quanto as amiláceas são responsáveis pela obtenção do chamado etanol de primeira geração. No Brasil, a produção de

etanol é realizada através do caldo de cana de açúcar, um caldo rico em açúcares e industrialmente chamado de melaço.

Além da cana de açúcar, a beterraba e o sorgo sacarino têm apresentado grande potencial como fonte de açúcares para a produção de etanol de primeira geração (RAELE *et al.*, 2014). A beterraba é utilizada como fonte de açúcar em países da Europa e América do norte, sendo utilizada para produção de biocombustíveis na França. Os bons rendimentos (25-50 galões por hectare) provenientes do uso da beterraba como fonte de açúcares a credencia como uma fonte de energia alternativa a cana de açúcar. Porém, o uso da beterraba para produção de etanol requer um grande gasto energético e uma alta demanda de compostos químicos utilizados no processo de extração do açúcar, tornando o processo mais caro do que com a cana de açúcar. (KOJIMA; JOHNSON, 2005; PATHAK, 2014)

Embora tenha uma quantidade significativa de açúcar em sua composição, o sorgo sacarino apresenta baixo cultivo em relação à cana de açúcar e a beterraba. O açúcar contido no sorgo sacarino se encontra estocado nos talos, sendo obtido através do processo de moagem, similar ao ocorrido com a cana de açúcar. Em média, o rendimento do sorgo sacarino fica em torno de 20 galões por tonelada de talos. (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007) Outra fonte primária de açúcares é a biomassa amilácea, geralmente composta por grãos, tais como grãos de milho, trigo e malte. O grão de milho, por exemplo, contém de 60 a 70% de amido em sua composição. O amido presente nos grãos é composto por longas cadeias de unidades de glicose. Para se produzir etanol através de amido é necessário quebrar as longas cadeias deste carboidrato para a obtenção de um xarope de glicose, que pode ser convertido em etanol através da ação de leveduras. Este tipo de matéria prima é a mais utilizada para a produção de etanol na América do Norte e Europa (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). Em países tropicais, tubérculos, como a mandioca, podem ser utilizados para a produção comercial de etanol combustível. A produção de etanol através da mandioca é uma alternativa promissora para o futuro, oferecendo vantagens tais como alta taxa de fixação de dióxido de carbono, grande eficiência de uso da água, elevadas concentrações de carboidratos e alta taxa de conversão de amido em etanol quando comparado com outras culturas. (KRISTENSEN *et al.*, 2014)

A expansão da produção de etanol a partir de muitas dessas matérias-primas, desencadeia, assim, o debate sobre alimentos versus combustível, limitando o uso de matérias primas de primeira geração para produção de etanol. Assim, para a produção de etanol de grau combustível sustentável, matéria-prima não alimentar deve ser utilizada (resíduos

agroindustriais). Há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de etanol de segunda geração, tendo em vista a crise do petróleo bem como a utilização de resíduos para obtenção de combustível de fonte renovável (BALAT; BALAT, 2009).

2.4 Fontes secundárias de açúcares

Ao invés da utilização de apenas açúcares facilmente extraíveis, amidos ou óleos como acontece na produção de biocombustíveis de primeira geração, os biocombustíveis de segunda geração não utilizam recursos alimentares como matéria prima. Neste caso, o foco é em diferentes matérias primas e suas partes a fim de explorar uma gama maior de biomassas para a produção de biocombustíveis. Um exemplo de matéria prima que vem sendo amplamente investigada por pesquisadores é a biomassa lignocelulósica, oriunda de resíduos agroindustriais tais como cascas, palhas, farelos e resíduos de madeira. Como esta biomassa não é um recurso alimentar, afasta a preocupação sobre a questão dos alimentos versus combustíveis, bastante questionada quando se trata de biocombustíveis de primeira geração, sendo esta uma das suas principais vantagens. O Brasil, sendo o maior produtor de etanol de primeira geração do mundo, está se esforçando muito para produzir etanol de segunda geração de maneira econômica e fácil. (BABU *et al.*, 2014). A Figura 2.4.1 mostra as principais matérias primas lignocelulósicas utilizadas para a produção de etanol de segunda geração.

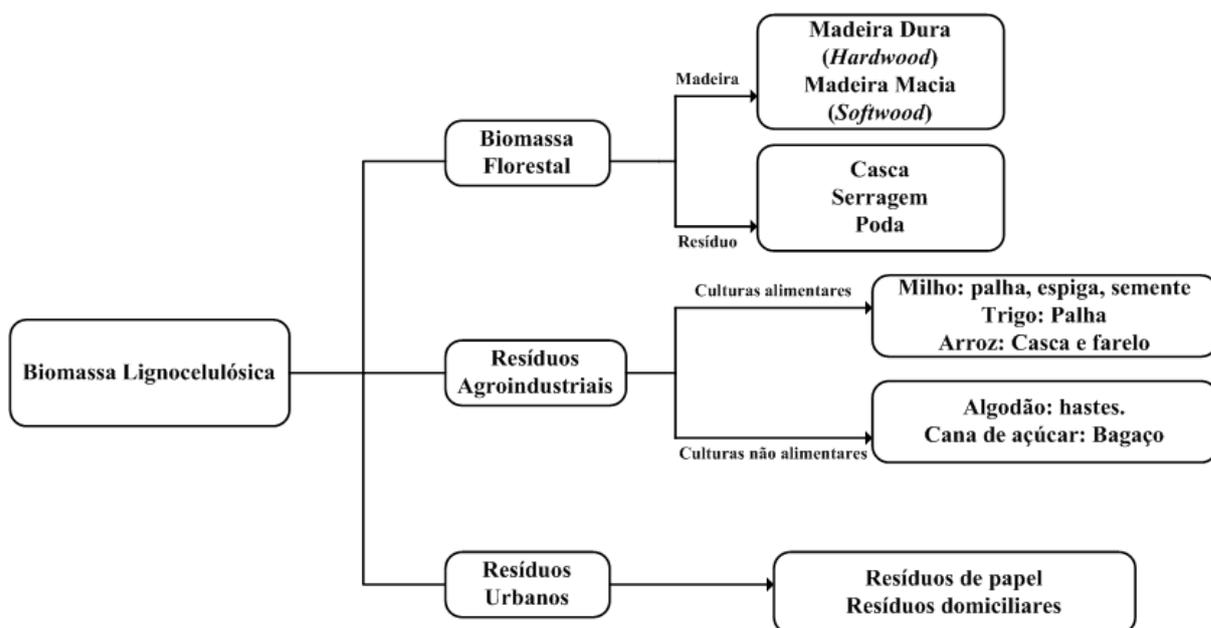


Figura 2.4.1 - Principais matérias primas lignocelulósicas para a produção de etanol. Fonte: BABU *et al.* (2014)

A matéria prima lignocelulósica é composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, que atua como um material fixador, ligando todos os demais constituintes morfológicos da matéria prima. A atuação da lignina é responsável por providenciar a rigidez estrutural presente nos materiais lignocelulósicos. A celulose é um polímero com repetidas cadeias de β -D-glicopiranosose e é o principal constituinte da biomassa lignocelulósica. Assim como a celulose, a hemicelulose é um polissacarídeo, porém menos complexo e de fácil hidrólise. Os açúcares presentes na celulose são na maioria glicose, diferente da hemicelulose, que contém uma mistura de açúcares em sua composição. A hemicelulose contém ambos C6 (glicose, manose e galactose) e C5 (xilose, arabinose e rhamnose). A Figura 2.4.2 apresenta a estrutura de um material lignocelulósico (FREDERICK *et al.*, 2008).

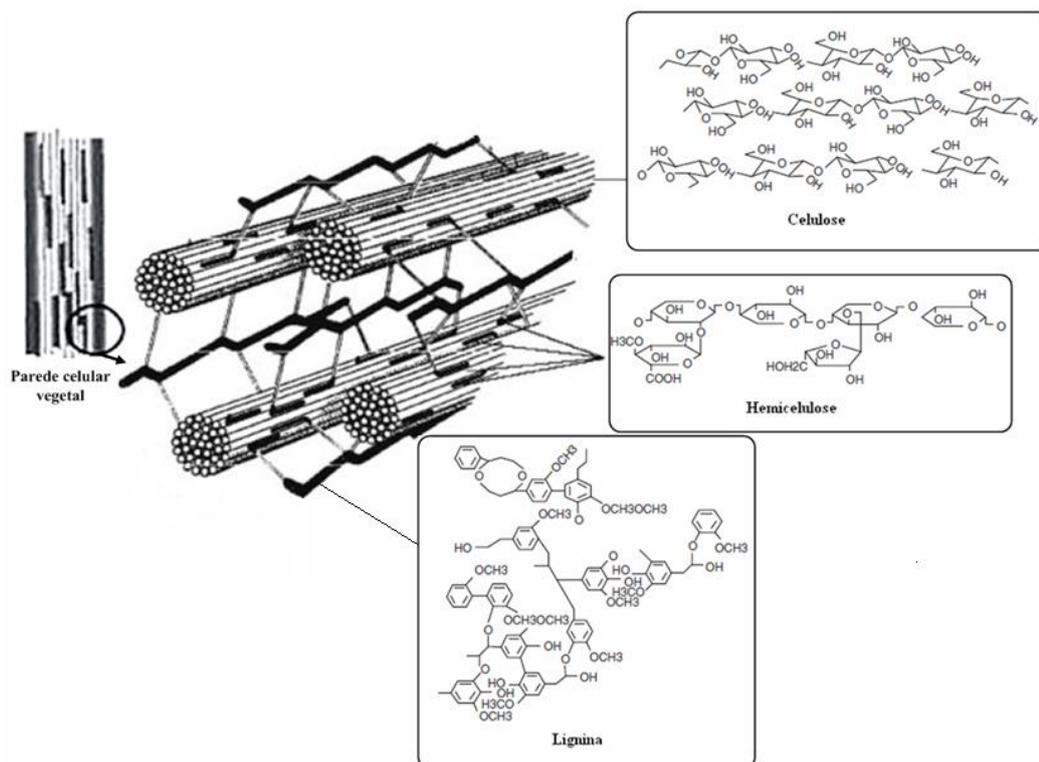


Figura 2.4.2 - Principais constituintes da matéria prima lignocelulósica. Adaptado de: (BABU *et al.*, 2014; PANDEY, 2011)

A estrutura rígida é a principal característica dos materiais lignocelulósicos e, como pode ser observado na Figura 2.4.2, a lignina é a responsável por manter esta característica. Para que a obtenção de açúcares fermentescíveis seja realizada se faz necessário a realização de etapas preliminares que irão transformar o material lignocelulósico em substrato pronto para o processo fermentativo. Existem inúmeros métodos de pré-tratamento de material lignocelulósico tais como: moagem, pirólise, pré-tratamento a vapor, pré-tratamento ácido, básico ou com dióxido de enxofre, hidrólise enzimática dentre outros. A composição química dos materiais lignocelulósicos é um fator chave para o desenvolvimento de biocombustíveis, podendo afetar a eficiência de produção dos biocombustíveis durante o processo de conversão. A composição estrutural e química da biomassa são altamente variáveis em função de influências genéticas e ambientais e, também, por se tratar muitas vezes de resíduos agroindustriais de diferentes culturas. Uma composição química dita típica é de 48% em massa de carbono, 6% em massa de hidrogênio e 45% em massa de oxigênio, sendo a matéria inorgânica a menor componente (BALAT, 2011). A Tabela 2.4.1 apresenta

a composição de algumas matérias primas lignocelulósicas utilizadas para a produção de etanol.

Tabela 2.4.1 - Composição em base seca de lignocelulose de várias fontes.

Biomassa Lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Caules de madeira dura	40–55	24–40	18–25
Caules de madeira mole	45–50	25–35	25–35
Cascas de nozes	25–30	25–30	30–40
Espigas de milho	45	35	15
Gramíneas	25–40	35–50	10–30
Papel	85–99	0	0–15
Palha de trigo	30	50	15
Folhas	15–20	80–85	0
Jornal	40–55	25–40	18–30
Resíduos de papel	60–70	10–20	5–10
Sólidos primários de esgoto	8–15	NA	24–29
Esterco bovino	1.6–4.7	1.4–3.3	2.7–5.7
Farelo de arroz	9-12.8	8,7-11,4	NA

Adaptado de:(SUN; CHENG, 2002)

2.4.1. Hidrólise

O processo de hidrólise vem sendo usado amplamente no processo de produção de etanol de segunda geração, oriundo de biomassa lignocelulósica. Os carboidratos presentes no material lignocelulósico precisam ser convertidos em açúcares simples antes do processo de fermentação (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Na ausência deste passo preliminar, o micro-organismo dificilmente irá converter os açúcares em etanol, tendo a necessidade da liberação do açúcar contido no material lignocelulósico, que se encontra protegido pela lignina (MARANGONI, 2003). Um método que tem se destacado é a hidrólise enzimática, sendo um processo eficiente e ambientalmente correto frente ao método de hidrólise ácida, que utiliza grandes volumes de reagentes, além do tratamento do ácido ao final do processo. Como o mercado de produção de enzimas vem crescendo e o preço para a obtenção deste catalisador biológico está mais acessível, a tendência é que o processo de hidrólise enzimática seja cada vez mais utilizado (LUO; VAN DER VOET; HUPPES, 2010). A

Figura 2.4.1 apresenta a ação catalítica que a enzima impõe no processo através da diminuição da energia de ativação da reação.

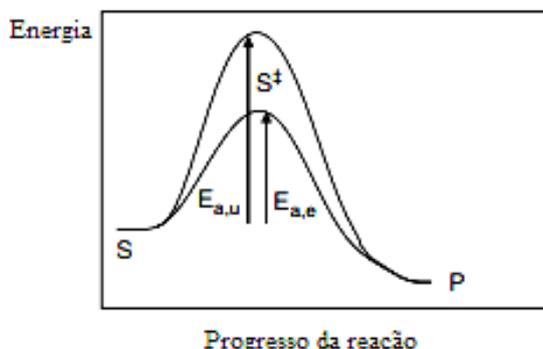


Figura 2.4.1 - Ação catalítica das enzimas. Fonte: Marangoni (2003).

Uma vez que a velocidade de uma reação química é proporcional à concentração do complexo do estado de transição (S^\ddagger), a redução da energia de ativação eficaz conduz a um aumento na taxa de reação. Uma enzima aumenta a velocidade de uma reação principalmente por se ligar especificamente ao substrato, e estabilizando, a estrutura de transição de estado. (MARANGONI, 2003)

Hidrólise compreende a quebra de polissacarídeos em açúcares simples, que possuem cadeias menores e que possam ser convertidos diretamente em etanol pelo micro-organismo. Muitos métodos para hidrólise de material lignocelulósico vêm sendo descritos, porém os métodos mais aplicados podem ser classificados em dois grupos: hidrólise química e hidrólise enzimática (BALAT, 2011). O último vem sendo muito empregado, pois apresenta um menor impacto ambiental e econômico, visto que os custos de recuperação dos ácidos na hidrólise ácida são altos e o tratamento de efluentes se torna mais complicado (VOHRA *et al.*, 2014).

Tendo em vista a diminuição do custo de produção de enzimas através do uso de biotecnologia, o processo de hidrólise enzimática se torna cada vez mais atrativo, oferecendo um melhor rendimento de açúcar frente à hidrólise ácida. Além disso, as enzimas possuem alta seletividade, apresentando rendimento de 75–95% em condições ótimas (pH 3,5 - 5,5 e temperatura 45 – 50 °C) na conversão da celulose e hemicelulose em glicose, pentoses e

hexoses, respectivamente (LYND *et al.*, 2002). Os três principais grupos das celulases que estão envolvidos no processo de hidrólise são: endoglucanase (EG, endo-1,4-D-glucanase), responsável por atacar as regiões de baixa cristalinidade nas fibras de celulose, criando cadeias livres; exoglucanase (CBH, 1,4- β -D-glucanase) que degrada a molécula através da remoção da celobiose a partir das cadeias livres; β -glucosidase que realiza a hidrólise, convertendo a celobiose em glicose. (SUN; CHEN, 2002). A Figura 2.4.2 mostra um esquema de ação do complexo enzimático em um material lignocelulósico.

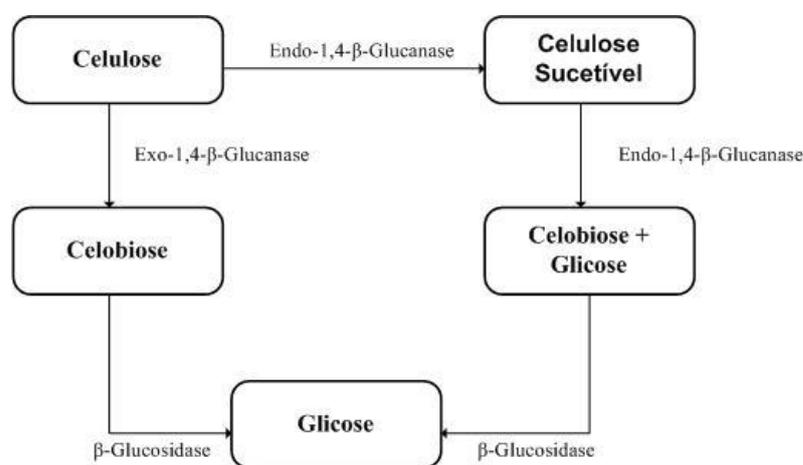


Figura 2.4.2 - Ação enzimática em material lignocelulósico. Fonte: Balat (2011).

2.5. Etanol de Segunda Geração

O etanol produzido através de materiais lignocelulósicos é conhecido como etanol de segunda geração e as matérias primas para a sua produção incluem efluentes domiciliares, resíduos agroindustriais (farelo de arroz, bagaço de cana de açúcar) e resíduos de madeira. (ROCHA *et al.*, 2013) Enormes esforços vêm sendo realizados no desenvolvimento econômico de segunda geração ou tecnologias avançadas para a produção de etanol combustível. No entanto, existem alguns desafios para as aplicações comerciais das tecnologias avançadas (CHENG; TIMILSINA, 2011).

No ano de 2014, uma empresa brasileira de grande porte deu início na primeira unidade industrial de produção de etanol de segunda geração do país, utilizando um projeto bastante inovador e tendo capacidade de produzir cerca de 82 milhões de litros de etanol de segunda geração por ano. A principal vantagem do etanol de segunda geração se deve ao conceito de sustentabilidade, explicado pelos seguintes motivos:

- não há necessidade de investimento na ampliação do plantio da cultura de interesse (cana de açúcar, neste caso);
- a produção de etanol de segunda geração é realizada através de resíduos tais como a palha e o bagaço da cana de açúcar, que seriam queimados ou descartados nos canaviais.

Outro aspecto importante está nos resíduos do processo, como a lignina e a vinhaça. A primeira, que não existe no processo convencional, é queimada em caldeiras para gerar energia e alimentar tanto a unidade industrial quanto a rede elétrica externa. Por sua vez, a vinhaça pode ser utilizada como fertilizante, pois é fonte rica em nitrogênio, sódio e potássio. A tecnologia utilizada pode ser visualizada na Figura 2.5.1. (GRANBIO, 2014)

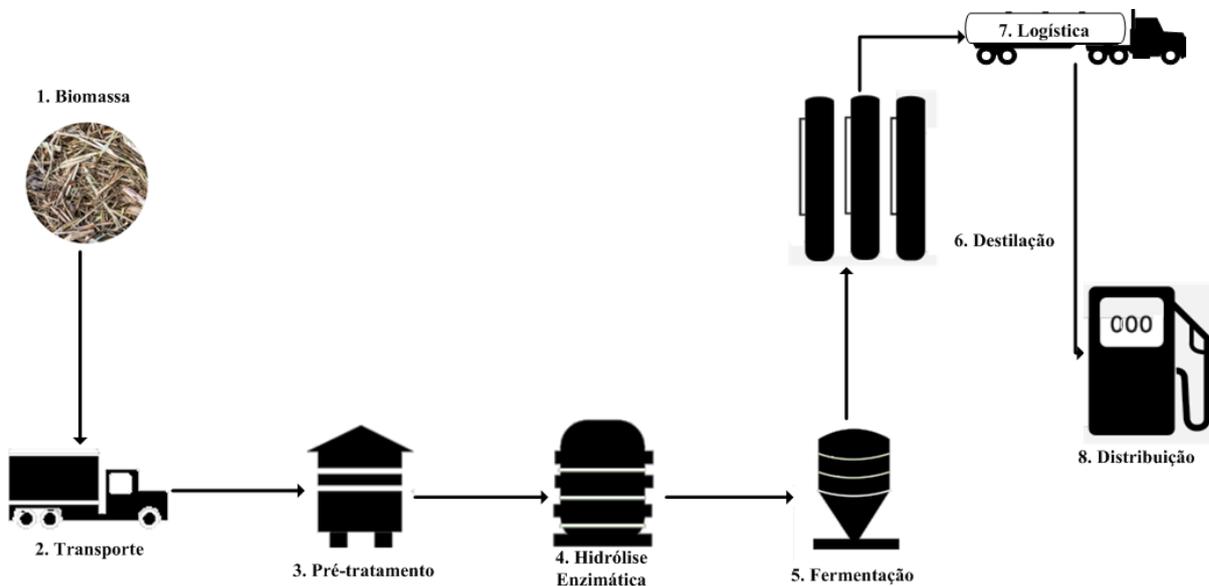


Figura 2.5.1 - Esquema de produção de etanol de segunda geração através do bagaço de cana de açúcar. (GRANBIO, 2014)

Diferente da produção de etanol de primeira geração, o etanol 2G necessita um maior número de etapas para sua produção. Como pode ser observado na Figura 2.5.1, existe a necessidade da realização de um pré-tratamento, seguido de um processo de hidrólise para que a biomassa seja levada para o processo de fermentação. O pré-tratamento da biomassa geralmente é realizado a altas pressões e temperaturas, a fim de romper a lignina e liberar a celulose e hemicelulose para que seja realizado o processo de hidrólise. Por sua vez, o procedimento de hidrólise atualmente é executado por enzimas, que se tornaram atraentes para o mercado atual através da redução nos seus custos de produção e pelas preocupações ambientais causadas por métodos de hidrólise convencionais, como por exemplo, a hidrólise ácida. A conversão bioquímica de materiais lignocelulósicos através de sacarificação e fermentação é um excelente caminho para a produção de etanol de segunda geração. A dificuldade da bioconversão é devido à resistência natural para romper a biomassa, a variedade de açúcares que são liberados quando a hemicelulose e a celulose são quebradas e a necessidade de encontrar organismos compatíveis para metabolizar tais açúcares. Os passos básicos para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos são pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação do produto final. Diversos estudos propuseram diferentes configurações de biorreatores a fim de melhor adequar às etapas envolvidas no processo (BRETHAUER; WYMAN, 2010).

2.6. Fermentação submersa

De acordo com Mosier e Ladisch (2009), entende-se por fermentação submersa o processo em que micro-organismos são cultivados em grandes tanques agitados preenchidos por meio de fermentação líquido consistindo de açúcares, vitaminas, minerais e outros nutrientes. Dependendo do micro-organismo utilizado no processo, a fermentação pode ser aerada ou não aerada. Portanto, caracteriza-se como processo de fermentação submersa aquele em que os micro-organismos se encontram submersos em um meio líquido, aonde irão se desenvolver e excretar os produtos de interesse, desde que expostos em condições ditas ideais.

A indústria da fermentação tem produzido diversos produtos alimentícios e bebidas ao longo de décadas. Além disso, através do processo de fermentação submersa, em 1943, foi produzido o primeiro antibiótico. Atualmente, produtos como etanol, acetona, glicerol e

butano vêm sendo desenvolvidos através de fermentação submersa. (YLITERVO *et al.*, 2014; MOSIER, LADISCH, 2009).

A fermentação submersa é o processo tradicional para a produção de etanol de primeira geração. A produção de etanol de primeira geração é realizada através da fermentação de açúcares dissolvidos no meio fermentativo, que são obtidos diretamente a partir da matéria prima, ou seja, não necessitam de nenhum tratamento para a transformação da matéria prima em sacarose. De fato, a obtenção de etanol de primeira geração depende apenas da disponibilidade de açúcares simples que serão convertidos diretamente em etanol pelo micro-organismo fermentador. Para viabilizar o processo, as moléculas de açúcar devem ser pequenas o bastante para serem metabolizadas no meio líquido e em escala microscópica. (HO *et al.*, 2012; ZHENg *et al.*, 2012).

As principais matérias primas utilizadas para a produção de etanol de primeira geração são a cana de açúcar, o milho, o sorgo sacarino e a beterraba (KOJIMA; JOHNSON, 2005). A Figura 2.6.1 apresenta as principais etapas da produção de etanol de primeira geração através da matéria prima mais utilizada no Brasil, o caldo de cana de açúcar.

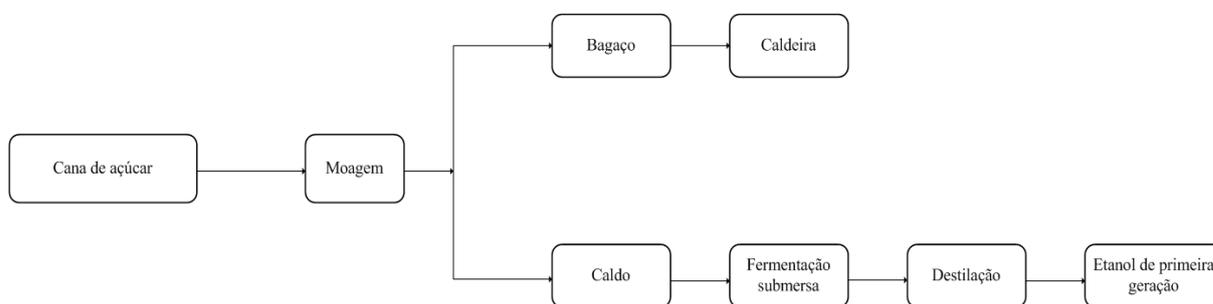


Figura 2.6.1 - Principais etapas da produção de etanol de primeira geração a partir do caldo de cana de açúcar.

De acordo com a Figura 2.6.1, primeiramente o açúcar é extraído pelo processo de moagem, resultando no caldo de cana de açúcar. Então, hidróxido de cálcio é adicionado a fim de precipitar a fibra e o lodo. A mistura é então filtrada, e o filtrado é evaporado a fim de concentrar o açúcar. O açúcar não cristalizado e os demais sais presentes são concentrados na forma de xarope chamado de melaço, que é usado como matéria prima e, subsequentemente convertido em etanol. Depois do processo de extração, a concentração de açúcar deve ser ajustada na faixa de 14-18% a fim de atingir uma eficiência ótima no processo de fermentação

(Submersa ou em estado sólido) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o micro-organismo mais utilizado no processo em temperaturas na faixa de 33 – 35 °C. (WYMAN, 2004). O processo de fermentação é interrompido a uma concentração de etanol de aproximadamente 10% (v/v), quando o micro-organismo começa então a ser inibido pelo produto final (etanol). O mosto fermentado é enviado para a fase de separação, geralmente realizado através do processo de destilação e fase de retificação, onde o produto é uma solução azeotrópica de etanol 95% (v/v) (CHIARAMONTI, 2007).

2.6.1. Condução de um processo de fermentação submersa

Segundo Schmidell e Facciotti (2001), existem várias formas de se conduzir um processo de fermentação alcoólica, havendo a possibilidade de realizar um processo descontínuo, descontínuo alimentado ou até mesmo um processo contínuo. Cada processo tem características particulares e se adapta melhor ao micro-organismo utilizado e as condições de processo. A Tabela 2.6.1 apresenta as diferentes formas de condução de um processo de fermentação submersa e suas principais características.

Tabela 2.6.1 - Forma de condução de um processo de fermentação submersa e suas principais características. Fonte: Schmidell (2001).

Forma de condução do processo	Principais características
Batelada (descontínua)	Melhor controle da assepsia; Inoculação direta no meio esterilizado; Adição somente de oxigênio e nutrientes; Volume reacional constante; Baixos rendimentos e possibilidade de inibição
Batelada alimentada	Adição de nutrientes durante o cultivo do micro-organismo; Adição do mosto continua ou intermitentemente
Contínuo	Alimentação contínua do meio de cultura e uma vazão constante; Volume reacional mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado; Operação em estado estacionário; Operação por longos períodos de tempo

2.7. Fermentação em estado sólido

O processo de fermentação em estado sólido envolve o crescimento de micro-organismos em partículas sólidas úmidas, onde os espaços entre as partículas estejam preenchidos por uma camada gasosa e o mínimo de água (MAZUTTI *et al.*, 2006). Embora gotículas de água possam estar presentes na superfície, e possa existir um biofilme de água na superfície da partícula, a fase aquosa inter-partícula é descontínua e a maior parte do espaço inter-partícula é ocupado pela fase gasosa. Grande parte da água presente no sistema é absorvida pela partícula, tendo maior ou menor absorção dependendo das características da matriz sólida adotada no processo. A Figura 2.7.1 apresenta um esquema das partículas sólidas úmidas e a fase gasosa contínua envolvendo um organismo unicelular.

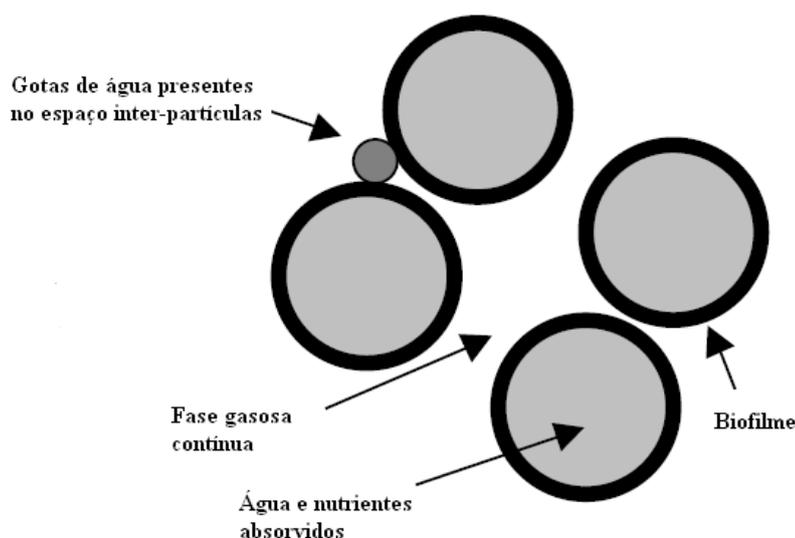


Figura 2.7.1 - Esquema das partículas sólidas úmidas e fase gasosa contínua envolvendo um organismo celular. Fonte: Mitchell *et al.* (2006)

De uma maneira geral, segundo nomenclatura adotada por M^oo-Young *et al.* (1983), fermentação de substrato sólido é chamada qualquer tipo de fermentação que envolve matérias primas sólidas, incluindo suspensões de partículas sólidas em fase líquida contínua. Outra definição, realizada por Durant *et al.* (1988), diz que a fermentação em estado sólido pode ser definida como a cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o teor de líquido ligado a ela esteja a um nível de atividade de água que,

por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida. De acordo com Pandey *et al.* (2000), os termos fermentação em estado sólido e fermentação em substrato sólido vêm sendo ambigualmente utilizados. A ocorrência de uma distinção lógica para os termos citados acima é relatada por Pandey *et al.* (1999), sendo definido como fermentação em substrato sólido apenas o processo em que o substrato atua como fonte de carbono (energia), ocorrendo na ausência ou com o mínimo possível de umidade. Por outro lado, o processo de fermentação em estado sólido se refere a qualquer fermentação que ocorre na ausência ou quantidade mínima de água, empregando uma matriz sólida inerte como suporte. A matriz ou substrato sólido em que o micro-organismo irá se desenvolver pode ser de dois tipos: quando o substrato sólido participa diretamente do processo fermentativo, sendo a fonte de nutrientes para o desenvolvimento do processo ou quando os nutrientes estão solúveis em um meio de cultura e os micro-organismos estão aderidos a um suporte sólido.

Em relação ao processo tradicional de fermentação submersa, o processo de fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens. Rocha *et al.* (2013) relata que a utilização do processo de fermentação em estado sólido se torna interessante com base nas seguintes características:

- uso de meios de crescimento e de produção compostos basicamente por resíduos agroindustriais;
- menor deposição de efluentes;
- simplicidade e habilidade para manuseio de pequenos volumes de produto final;
- menor energia requerida no processo e
- maior facilidade para a purificação do produto final.

Até então, fermentação em estado sólido vem sendo testada para a produção de compostos industrialmente relevantes, tais como aromatizantes e antioxidantes fenólicos, ácidos orgânicos, enzimas, biocombustíveis, herbicidas, dentre outros. (SINGHANIA *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2011) realizaram o estudo da produção de celulases através de uma cepa modificada do micro-organismo *Penicillium decumbens* através de fermentação em estado sólido utilizando farelo de arroz, obtendo uma atividade enzimática ótima de $5,76 \text{ IU g}^{-1}$, atingindo rendimento de 44,2% superior que a cepa original utilizada em experimentos semelhantes.

Da mesma forma, Mazutti *et al.* (2010) observaram a cinética de produção de inulinas utilizando um meio de cultivo composto por bagaço de cana de açúcar suplementado com água de maceração de milho e farelo de soja, através de um processo de fermentação em estado sólido em um biorreator de leito fixo.

A possibilidade de obtenção de gorduras e células proteicas foi estudada por Aggelopoulos *et al.* (2014). A investigação foi baseada na utilização de um processo de fermentação em estado sólido através de resíduos alimentares e utilizando micro-organismo de interesse, tais como *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

Uma aplicação atraente para o processo de fermentação em estado sólido é seu uso na produção de biocombustíveis. O processo de produção de etanol combustível através de recursos renováveis vem sendo cada vez mais utilizado, com intuito de substituírem combustíveis fósseis oriundos do petróleo (fonte não renovável) e pela utilização de resíduos agroindustriais que não competem diretamente com alimentos de consumo humano e animal.

Atualmente, muitos estudos tem voltado a atenção na obtenção de biocombustíveis, como no caso de etanol. Yu *et al.* (2008), por exemplo, estudaram a produção de etanol através dos talos de sorgo sacarino (resíduo do processo de moagem), atingindo uma concentração de etanol de 7,9 gramas de etanol por 100 gramas de talos frescos (0,46 gramas de etanol por grama de açúcar). Da mesma maneira e utilizando a mesma biomassa, Molaverdi *et al.* (2013) realizaram estudos a respeito da produção de etanol através de um processo de fermentação em estado sólido utilizando fungos *Mucor indicus* seguido de um procedimento de sacarificação e fermentação simultâneo utilizando os resíduos sólidos inertes do processo anterior. Neste caso, uma produção de 0,48 gramas de etanol por grama de açúcar foi obtido para o primeiro estágio do processo.

2.7.1. Biorreatores para fermentação em estado sólido

Tendo em vista a produção em escala industrial utilizando o processo de fermentação em estado sólido, a escolha de equipamentos adequados para a realização do processo se torna essencial. Diferente do processo de fermentação submersa, que apresenta várias formas de condução de processo, a fermentação em estado sólido geralmente é realizada em batelada. Entretanto, existem várias configurações do processo, através da utilização de diferentes

biorreatores. A escolha da configuração do biorreator depende dos objetivos da fermentação, da análise econômica do processo, da manipulação do sistema (carregamento, descarregamento, limpeza e manutenção) e da possibilidade de monitoramento e controle do processo. (DURAND, 2003; DEL BIACHI *et al*, 2001; CANNEL e MÔO-YOUNG, 1980). A Tabela 2.7.1 apresenta as principais configurações de biorreatores em estado sólido segundo as descrições feitas por Mitchell *et al*. (2006), que separou as distintas configurações em grupos.

Tabela 2.7.1- Grupos e configurações dos biorreatores em estado sólido. Fonte: Mitchell *et. al* (2006).

Grupos	Característica do Biorreator
Grupo I	não aerados e não agitados
Grupo II	forçadamente aerados e não agitados
Grupo III	tambores rotativos
Grupo IVa	continuamente agitados e forçadamente aerados
Grupo IVb	intermitentemente agitados e forçadamente aerados
Grupo V	contínuos

Com base nos grupos apresentados na Tabela 2.7.1 e com a configuração que será utilizada neste trabalho, foi realizada uma abordagem mais detalhada do Grupo I e do Grupo II de biorreatores para fermentação em estado sólido. Neste trabalho será utilizado um reator que mescla as características dos dois grupos citados. Sendo assim, segue abaixo uma descrição detalhada da operação e principais características dos grupos de biorreatores que apresentam características semelhantes ao biorreator utilizado neste trabalho.

2.7.1.1. Grupo I de biorreatores

Neste grupo de equipamentos são descritos os biorreatores do tipo bandeja, que representam a tecnologia mais simples de biorreatores para fermentação em estado sólido. Durante muitas décadas estes equipamentos vêm sendo utilizados na produção de alimentos fermentados tais como o *tempe* e na produção de molho de soja *koji*. Além disso, biorreatores do tipo bandeja são considerados candidatos na seleção de biorreatores para o desenvolvimento de processos inovadores envolvendo fermentação em estado sólido. A Figura 2.7.2 apresenta um *design* tradicional dos biorreatores do tipo bandeja.

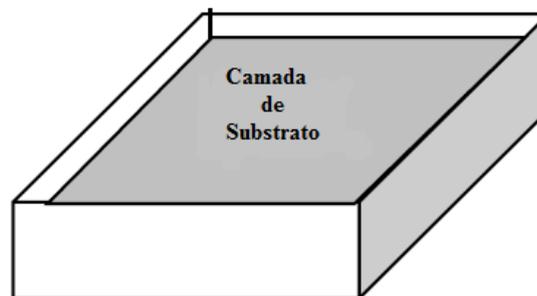


Figura 2.7.2 - Biorreatores do tipo bandeja. Fonte: Mitchell *et al.* (2006)

Por mais que pareçam equipamentos simples, estes biorreatores podem sofrer algumas alterações em suas configurações tais como:

- a bandeja pode ser construída de diversos materiais (madeira, bambu, arame etc.);
- o fundo e os lados podem ser perfurados, auxiliando no aumento da eficiência no transporte de calor e massa;
- suas dimensões podem ser adaptadas ao processo de interesse (largura, altura e comprimento da bandeja) e
- podem estar presentes superfícies de troca de calor refrigeradas com água.

Apesar de ser um biorreator estático, o leito pode ser agitado a cada determinado período de tempo. Esta agitação é feita manualmente, onde o operador vira a bandeja em intervalos de tempo estipulados para o processo, geralmente de uma a duas vezes por dia.

2.7.1.2 Grupo II de biorreatores

Os equipamentos descritos neste grupo são biorreatores de leito fixo, configuração de biorreator usada tipicamente em processo onde não se faz necessária a agitação do substrato durante todo o processo de fermentação em estado sólido devido a efeitos prejudiciais sobre qualquer crescimento microbiano ou a estrutura física do produto final (MITCHELL *et al.*, 2000). A Figura 2.7.3 apresenta a configuração básica de um reator de leito fixo.

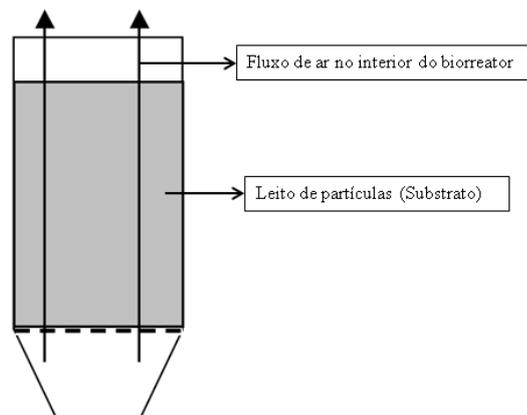


Figura 2.7.3 - Biorreator do tipo leito fixo. Fonte: Mitchell *et al.* (2006)

Além da configuração tradicional apresentada na Figura 2.7.3, ao longo dos anos muitas pesquisas vem sendo realizadas a fim de sanar o principal problema relacionado aos biorreatores de leito fixo, o calor metabólico. Como não é agitado, a dissipação de calor é feita por evaporação, que pode ser indesejável mesmo com a utilização de ar úmido na alimentação do reator, através da desidratação do leito de substrato (GUTIERREZ-ROJAS *et al.*, 1996; ROUSSOS *et al.*, 1992). Apesar disto, a utilização de biorreatores de leito fixo apresenta algumas variações na sua configuração inicial, tais como:

- a coluna pode ter uma secção transversal diferente da circular;
- a coluna pode estar na horizontal, ou para essa matéria, em qualquer ângulo.

Isto altera as instruções relativas das forças de gravidade e devido à pressão de ar;

- a coluna pode ser arejada a partir de ambas as extremidades. Para uma coluna vertical, o ar pode entrar na cama a partir de qualquer parte superior ou inferior. Gaseificar a partir do topo evita a fluidificação das partículas em altas velocidades de ar, mas irá contribuir para a compactação do leito já que o fluxo de ar está na mesma direção como a gravidade;
- a coluna pode ter um tubo perfurado inserido ao longo do seu eixo central, o que permite um fornecimento de ar adicional para além da extremidade de arejamento-terminal. No entanto, isso só será eficaz para diâmetros muito pequenos biorreatores.

2.8. Sacarificação e Fermentação Simultânea

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica requer algumas etapas preliminares, como por exemplo, a etapa de sacarificação, que subentende basicamente a transformação da biomassa lignocelulósica em sacarose. Além do pré-tratamento, o modo de processo utilizado para sacarificação e fermentação também é um fator importante que afeta os custos de produção. Segundo relata Wright *et al.* (1988), a sacarificação pode ser realizada através do processo separado de hidrólise e fermentação ou pelo processo de sacarificação e fermentação simultâneo. A utilização do processo de sacarificação e fermentação simultâneo

vem se destacando frente a processo separado de hidrólise e fermentação, principalmente devido a um menor consumo de energia, maior rendimento de etanol, redução do tempo de processo, menores riscos de contaminação e redução na inibição do produto final. (CHEN; LI, 2013; NIKOLIC *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2008; ; ÖHGREN *et al.*, 2007; MOJOVIC *et al.*, 2006; TAKAGI *et al.*, 1977). Pesquisas mundiais sobre bioetanol são impulsionadas pela necessidade de reduzir custos de produção. As buscas realizadas por pesquisadores se voltam para o melhoramento no pré-tratamento da matéria prima, na redução do tempo de fermentação, na diminuição das dosagens de enzimas no processo e maior eficiência na hidrólise do amido. Uma alternativa interessante é a integração do processo de sacarificação e fermentação simultâneo, que pode ser a base para diminuir os custos de produção (MIELENZ, 2001).

Por outro lado, o processo de sacarificação e fermentação simultâneo (SSF) apresenta um problema crítico referente às temperaturas ótimas de hidrólise de enzimas e dos organismos de fermentação. Cepas de *Sacharomyces cerevisiae* são micro-organismos produtores de etanol bastante conhecidos, mas sua temperatura de operação está em torno de 30 – 35° C, diferindo da temperatura ótima para o passo de sacarificação, 55 – 60° C. (SAHA *et al*, 2011; NIKOLIC *et al.*, 2010)

Sacarificação e fermentação são realizadas simultaneamente em um único reator, permitindo assim economia de custos, redução de inibidores e aumentando a taxa de hidrólise. Obviamente, a otimização das condições do processo relativo de ambas as enzimas e micro-organismos ao mesmo tempo é a questão crítica desta solução. A chave do processo SSF a partir de biomassa é a sua capacidade para rapidamente converter os açúcares em etanol, logo que eles são formados diminuindo seu acúmulo no meio. Tendo em vista que os açúcares são muito mais inibitórios para o processo de conversão do que o próprio etanol, o processo de sacarificação e fermentação simultâneo pode alcançar taxas mais elevadas de concentração de etanol em relação ao processo de hidrólise e fermentação separadas (BRETHAUER; WYMAN, 2010). O processo SSF oferece uma operação mais fácil e uma prescrição de equipamento inferior ao processo sequencial uma vez que não são necessários reatores de hidrólise. Além disso, a presença de etanol na mistura faz com que o caldo de reação se torne menos vulnerável à ação de micro-organismos indesejáveis (VINCENT *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2009; OHGREN *et al.*, 2007).

2.9 Extração de Etanol

No caso da fermentação em estado sólido, o etanol pode se encontrar adsorvido nos poros da matriz sólida, exigindo a aplicação de um processo extrativo para o beneficiamento do composto desejado ao final do processo. Desta maneira, surge a necessidade de um método eficaz para extrair compostos produzidos por fermentação em estado sólido do meio fermentativo. No caso do etanol, estudos realizados em torno desta preocupação ressaltam algumas alternativas de extração tal como a pervaporação do etanol através do meio fermentativo utilizando membranas, que é um processo extrativo relativamente caro, pois utiliza membranas hidrofóbicas antes de realizar o processo convencional de destilação para a recuperação do etanol (SUSHIL *et al.*, 2013).

Uma alternativa ao método de pervaporação para a concentração de etanol antes do processo de purificação através da destilação é o processo de extração sólido-líquido através da utilização de solventes denominados ambientalmente corretos como, por exemplo, a água destilada. Segundo McCabe (2005), existem duas possibilidades de se extrair compostos de uma matriz sólida e de uma mistura de líquidos através de um solvente líquido. Sendo assim, é interessante tanto do ponto de vista industrial quanto do ponto de vista econômico e ambiental, o estudo da extração de etanol obtido através da fermentação em estado sólido utilizando solventes denominados verdes, tais como a água. Tendo em vista a redução de gastos proveniente com o tratamento de resíduos oriundos dos processos fermentativos, o processo proposto tem como objetivo principal a tentativa de concentrar o máximo possível o etanol em meio aquoso garantindo uma eficiência de extração adequada para que o processo seja vantajoso.

2.10. Desafios para aumento de escala em FES

Segundo descreve Mitchell *et al.* (2006), quando tratamos de um processo tradicional de fermentação, como no caso da fermentação submersa, o principal desafio no aumento de escala do processo fica a cargo da transferência de oxigênio no meio líquido. As estratégias de aumento de escala que abordam este fenômeno de transferência, que é caracterizado pelo parâmetro *K_{la}*, já estão muito difundidas na comunidade científica e industrial, sendo de fácil disponibilidade e não oferecendo resistência a sua aplicabilidade.

Por outro lado, no processo de fermentação em estado sólido o principal desafio é a remoção do calor metabólico, que é gerado através da ação de um micro-organismo no meio fermentativo. De uma maneira geral, a remoção de calor de um leito de partículas úmidas envolvidas por uma fase gasosa (ar) é muito mais difícil do que a remoção de calor através de uma fase aquosa contínua e homogênea. Tal afirmação está baseada nas seguintes considerações:

- as propriedades térmicas de uma fase aquosa, conhecidas por condutividade térmica e capacidade calorífica, são superiores àsquelas de um leito de partículas sólidas úmidas e
- um processo com excelente agitação promove uma eficiente remoção do calor metabólico, colocando o meio em contato com partes frias dentro do biorreator. Todavia, em um processo de fermentação em estado sólido a agitação deve ser suave, a fim de evitar o rompimento de micelas de fungos filamentosos ou para sanar o problema de cisalhamento celular, no caso de leveduras e bactérias.

Sendo assim, a dificuldade de remoção do calor metabólico a partir de um processo de fermentação em estado sólido em larga escala está compreendida em dois aspectos:

- a evaporação pode ocorrer como o resultado de um aumento de temperatura no leito de partículas, uma vez que o mecanismo do processo é um dos mais eficazes para a remoção de calor. No entanto, um processo evaporativo contínuo pode vir a secar o leito, restringindo o crescimento celular e conseqüentemente o andamento do processo. Sendo assim, a manutenção da atividade mínima de

água no leito se torna fundamental para o *design* de fermentadores em estado sólido;

- dado que em fermentadores em estado sólido a fase gasosa (ar) desenvolve um papel fundamental na remoção de calor metabólico e que a taxa de aeração necessária para remover o calor metabólico a uma taxa razoável é mais do que suficiente para suprir a demanda de oxigênio através da superfície das partículas sólidas, o fornecimento de oxigênio se torna o menor dos problemas.

Desta maneira, conforme pode ser observada, a remoção do calor gerado através do metabolismo dos micro-organismos que realizam o processo de fermentação é um fator chave para o aumento de escala quando tratamos de fermentadores em estado sólido. A remoção deste calor metabólico está atrelada diretamente com a manutenção da atividade de água de meio fermentativo, o que possibilita o crescimento microbiano e conseqüentemente o desenvolvimento do processo (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003).

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia experimental utilizada neste trabalho foi dividida em duas etapas. Em um primeiro momento, a extração de etanol utilizando água destilada como solvente foi investigada, pois se trata de um desafio frente ao processo de fermentação em estado sólido. Em um segundo momento, foi efetuado o estudo do processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido, realizando também, um estudo sobre o aumento de escala do processo.

3.1. Estudo da extração do Etanol

3.1.1. Matéria prima e solventes

Nesta etapa do trabalho, o bagaço de cana de açúcar foi usado como substrato. O bagaço de cana de açúcar foi obtido de uma destilaria local, seco a 60 °C por 72 horas, moído e peneirado, coletando partículas que passaram através da peneira de MESH 16. As amostras foram então estocadas a temperatura ambiente sobre atmosfera de nitrogênio para posterior extração. O etanol foi obtido da Vetec – Brasil, com 99,8% de pureza. A Figura 3.1.1 apresenta o bagaço de cana de açúcar utilizado nesta etapa.



Figura 3.1.1 - Bagaço de cana de açúcar. Fonte: ÚNICA (2015)

3.1.2. Preparo da amostra e extração do etanol

Como o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes parâmetros na extração de etanol do bagaço de cana de açúcar após o processo de fermentação, é importante estudar um processo a partir de uma matéria prima onde se conheça a concentração de etanol e o teor de umidade. Por esta razão, foi decidido não efetuar as fermentações, por que não é possível determinar a quantidade real de etanol produzido no meio, devido a perdas por evaporação e pela adsorção do etanol na matriz sólida, o que implica em erros na determinação da eficiência do processo de recuperação. Para superar esta dificuldade, simulou-se uma fermentação com diferente teor de umidade (que varia de 50 a 80%) e uma quantidade de etanol (5-20% em peso), obtendo-se um material sólido com umidade e teor de etanol conhecidos, tornando possível a determinação correta da eficiência de recuperação.

Para este fim, 50 g de bagaço seco foram usadas em cada ensaio, sendo corrigida a umidade ao nível especificado usando água deionizada e esterilizados a 121 ° C durante 20 minutos, utilizando uma autoclave vertical (PRISMATEC), para manter as condições de assepsia. Em seguida, uma determinada quantidade de etanol foi adicionada ao meio sólido autoclavado e homogeneizada manualmente durante 10 minutos. O material sólido resultante

foi selado e mantido sob repouso durante 60 minutos para garantir uma absorção satisfatória de etanol no bagaço sólido.

Após o processo de fermentação simulado descrito acima, o material sólido foi usado para realizar a extração do etanol, onde um volume determinado de água deionizada foi adicionado visando atingir uma razão sólido/líquido especificada, seguindo de incubação e agitação orbital em um agitador orbital (Innova 44 - New Brunswick).

Ao término do tempo de extração, as amostras foram centrifugadas em uma centrífuga (Eppendorf 5804 R) a 4 °C, 18000 g durante quinze minutos, sendo posteriormente filtradas em papel filtro (Qualy 80g/m²) e por fim, reservando o sobrenadante em tubos criogênicos para posterior análise de determinação da quantidade de etanol recuperado. A recuperação do etanol foi avaliada a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30 e 60 minutos de extração. O resultado final foi a média aritmética de todos os resultados obtidos através das diferentes condições de fermentação.

As diferentes condições de fermentação tais como teor de umidade e concentração de etanol, bem como as diferentes condições de extração tais como a temperatura, agitação orbital e razão sólido/líquido, são apresentadas na Tabela 3.1.1. A influência das variáveis no processo de extração foi analisada considerando a metodologia de um fator por vez, onde se estipula o valor para uma variável e variam-se as demais, até que todas as condições sejam realizadas.

Tabela 3.1.1 - Diferentes condições de fermentação e extração para a recuperação de etanol.

Condições de fermentação	Teor de umidade	50 – 80%
	Concentração inicial de etanol	5 – 20 p/p
Condições de extração	Temperatura	30 – 50 °C
	Agitação orbital	50 – 180 rpm
	Razão sólido/líquido	0,1 – 0,4 p/p

3.1.3 Determinação do etanol

Após o processo de extração, uma alíquota (5 mL) do sobrenadante foi usada para a determinação direta do teor de etanol utilizando um densímetro digital (*Alcolyzer Wine M/WE – Wine Analysis system* - Antoon Par). Este analisador efetua a leitura da concentração alcoólica resultando em uma porcentagem volume/volume (% v/v), permitindo avaliar alíquotas cujas concentrações oscilam de 0 – 20% v/v e apresentando um erro de medição de aproximadamente 0,1 % v/v de álcool.

Os resultados obtidos, que são expressos em termos da concentração de etanol presente no meio fermentado (%v/v), foram convertidos em porcentagem mássica de etanol presente no meio fermentado, conforme apresenta a Equação 3.1.1.

$$EtOH_{\left(\frac{p}{p}\right)} = \frac{m_{ef}}{m_{st}} \times 100 \quad (3.1.1)$$

Onde $EtOH_{\left(\frac{p}{p}\right)}$ é o rendimento de etanol em gramas de etanol por quilograma de substrato, m_{ef} é a massa final de etanol encontrada na amostra e m_{st} é a massa total de substrato utilizado no processo. Por fim, a eficiência de recuperação determinada, considerando a concentração inicial adicionada pelo experimentador.

3.2 Estudo da produção de etanol de segunda geração

3.2.1 Matéria prima e micro-organismos

Neste trabalho, foram utilizados dois resíduos provenientes da indústria de beneficiamento de arroz, que não possuem valor agregado no mercado, a casca e o farelo de arroz. Os dois resíduos foram doados por uma indústria de beneficiamento de arroz local, no município de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul (Primo Berleze e Cia). Os resíduos foram recebidos no laboratório, secos em estufa de fluxo horizontal (60 °C, 48 horas), estocados em recipientes vedados, evitando a presença de insetos e posterior degradação das amostras. A Figura 3.2.1 mostra os dois resíduos utilizados neste trabalho.



Figura3.2.1 - Casca e farelo de arroz.

Para compor o meio de fermentação, ainda foram incluídos outros dois resíduos, o farelo de soja e a água de maceração de milho (AMM). Tais resíduos serviram como nutrientes para o processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido, sendo fonte principalmente de nitrogênio. Para realizar o processo de sacarificação foram utilizados duas enzimas, a celulase (*Novozymes* NS 50013) e a amilase (*Spirizyme Fuel – Novozymes*). O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a *Saccharomyces cerevisiae* desidratada (fermento biológico desidratado *Fleischmann*), obtida através do comércio local, no município de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. Para manter sua inatividade, a levedura foi estocada em ambiente climatizado (4°C), junto ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (Brasil). Para o inóculo, um meio sintético foi usado, compreendendo os reagentes descritos na Tabela 3.2.1.

Tabela 3.2.2 - Meio sintético para confecção do inóculo.

Reagente	Concentração (g/L)
Sacarose	20
Extrato de Levedura	5
KH_2PO_4	5
NH_4Cl	1,51
KCl	1,15
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,65

O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,8 utilizando NaOH 1 N como requerido. O inóculo foi preparado em erlenmeyers (250 mL) através da adição de 1 g de *Saccharomyces cerevisiae* em 100 mL de meio, sendo mantidos sob constante agitação e temperatura controlada em uma incubadora (Innova 44 - New Brunswick) a 36 °C ±2,0 °C e por 24 horas

3.2.2 Preparo e esterilização das amostras

As amostras de casca e farelo de arroz foram colocadas em frascos de 600 mL, em proporções especificadas de acordo com o planejamento de experimentos utilizado. O uso da casca de arroz não está vinculado como um substrato para o processo de fermentação, mas sim a um material que irá desempacotar o leito de partículas de farelo de arroz, que possuem diâmetros pequenos, aumentando o fator de empacotamento do leito e dificultando a transferência e retirada de calor metabólico gerado no processo. Por sua vez, a umidade da amostra foi corrigida através da adição de água destilada, e de acordo com a equação 3.2.2, que faz a correção da umidade do substrato em base seca.

$$\%H_2O = \frac{m_{H_2O}}{m_{H_2O} + m_s} \quad (3.2.2)$$

Onde $\%H_2O$ é a umidade requerida no meio fermentativo, m_{H_2O} é a massa de água que deve ser adicionada ao meio fermentativo a fim de corrigir a umidade do mesmo e m_s corresponde a massa de substrato utilizada no processo. Junto do volume de água destilada necessária para correção da umidade, nutrientes como água de maceração de milho (AMM) e farelo de soja foram adicionados, compondo então o meio de fermentação. Por fim, todo material que será utilizado no processo de sacarificação e fermentação simultâneo foi esterilizado através da aplicação de calor úmido direto em uma autoclave vertical (PRISMATEC) a 121 °C, por 30 minutos. Ao fim do tempo de esterilização, os frascos contendo o meio fermentativo foram retirados da autoclave e levados para uma câmara de fluxo laminar (MARCONI), evitando qualquer tipo de contaminação por agentes externos. O processo de esterilização é fundamental para processos que envolvem crescimento microbiano, tanto antes do processo quanto ao fim do mesmo, evitando a disseminação de doenças e contaminações através dos micro-organismos utilizados para se obter os produtos finais de interesse (SCHMIDEL, 2001).

3.2.3 Sacarificação e fermentação em estado sólido simultânea

Os ensaios de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido foram realizados em frascos de 600 ml, contendo 100 g de substrato (farelo e casca de arroz) em proporções definidas através de um planejamento de experimentos. A Figura 3.2.3 apresenta um esquema do processo.

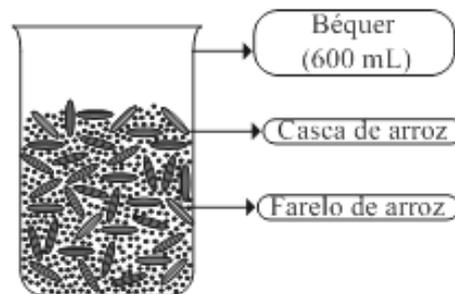


Figura 3.2.3 - Sacarificação e fermentação em estado sólido simultâneo em escala de bancada.

Os ensaios de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido foram realizados a temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e 24 horas. A fim de identificar as variáveis mais significativas que afetam diretamente o processo de produção de etanol por sacarificação e fermentação em estado sólido, foi realizado um delineamento de seleção de fatores, através da aplicação de um planejamento de experimentos do tipo Plackett & Burman, ideal para esse tipo de técnica (RODRIGUES; IEMMA, 2014). A Tabela 3.2.2 apresenta os níveis do planejamento Plackett & Burman 16 (PB16), utilizado nesta etapa.

Tabela 3.2.2 - Parâmetros avaliados e níveis codificados para o PB 16.

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	35	40
S (F/C)	50/50	62,5/37,5	75/25
Inoculo (%)	5	10	15
Umidade (%)	60	70	80
AMM (%)	5	10	15
Farelo de Soja (%)	5	10	15
Amilase (%)	0,2	0,4	0,6
Celulase (%)	0,2	0,4	0,6

Onde: S (F/C) é massa de farelo de arroz (F) e casca de arroz (C) (g/g).

O design PB é um planejamento de experimentos fatorial de dois níveis e permite a investigação de $n-1$ variáveis em n experimentos (PLACKETT; BURMAN, 1946). Segundo Rodrigues e Iemma (2014), tais delineamentos são utilizados para a seleção de fatores (*Screening*) e, portanto, constituem apenas um passo intermediário de orientação para o encaminhamento final. Os procedimentos de extração e a quantificação do etanol foram realizados com base no estudo apresentado no item 3.1 desta dissertação.

Nesta etapa do processo foi realizada uma análise estatística utilizando o software STATISTICA 7.0, onde foram determinados os parâmetros significativos em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os parâmetros que não se mostraram significativos foram utilizados na próxima etapa do processo com valores fixados no correspondente ao valor de seu nível inferior (-1) adotado no planejamento inicial (PB 16). Como não são significativos estatisticamente, tais parâmetros não se mostram essenciais para o processo e, por questões econômicas foram utilizados em concentrações mínimas. Após identificar os parâmetros significativos para a produção de etanol via sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido através de um planejamento de experimentos Plackett & Burman, a metodologia de superfície de resposta foi empregada para aperfeiçoar a produção de etanol. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) com cinco níveis codificados (-1,41, -1, 0, +1, +1,41) foi realizado em um delineamento de 12 experimentos com quatro réplicas no ponto central. Os níveis das variáveis investigadas no DCCR estão compreendidos na Tabela 3.2.3.

Tabela 3.2.3 - Parâmetros avaliados e níveis codificados.

Parâmetros	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Substrato (F/C)	44,9/55,1	50/50	62,5/37,5	75/25	80,1/19,9
Umidade (%)	60,9	65	75	85	89,1

Onde: S (F/C) é massa de farelo de arroz (F) e casca de arroz (C) (g/g) e U é a umidade do meio.

Adicionalmente, foram realizados cinco ensaios para que fosse avaliada a influência do complexo enzimático amilolítico que, conforme a análise realizada através do planejamento Plackett & Burman, foi significativa com 95% de confiança. A escolha por realizar este passo do planejamento separado se deve basicamente ao fator econômico, pois hoje em dia adquirir enzimas é uma ação bastante dispendiosa mesmo com os avanços na sua produção. Como não tínhamos um volume de enzimas suficiente até o término desta dissertação, optou-se por reduzir ao máximo o uso das mesmas a fim de concluir o restante do trabalho. A Tabela 3.2.4 apresenta os cinco ensaios realizados para avaliar a influência da concentração de amilase no processo de sacarificação e fermentação em estado sólido simultâneo.

Tabela 3.2.4 - Análise da influencia do complexo amilolítico na produção de etanol.

Ensaio	S (F/C)	U (%)	A (%)
1	62,5/37,5	75	0
2	62,5/37,5	75	0,5
3	62,5/37,5	75	1,0
4	62,5/37,5	75	1,5
5	62,5/37,5	75	2,0

Onde: S (F/C) é a massa de farelo de arroz (F) e casca de arroz (C) (g/g), U é o teor de umidade do meio e A é a concentração de enzima amilase (% v/p).

Após a determinação das condições ótimas para a produção de etanol por sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido foi realizado um estudo cinético com fins de validar o processo de produção de etanol. O ponto ótimo foi determinado através da superfície

de contorno obtido no delineamento composto central rotacional e alíquotas foram retiradas nos tempo de 6,12,18,24,30 e 36 horas, avaliando a produção de etanol e o consumo de glicose pelo micro-organismo. As análises de açúcares redutores foram realizadas através do procedimento de DNS (Miller, 1959). Ao fim do processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido, todos os resíduos e materiais utilizados no processo retornam para a etapa de esterilização. Os resíduos da fermentação são estocados em recipientes adequados e levados para destinação ambientalmente correta.

3.3 Aumento de escala

A metodologia empregada nesta etapa do trabalho é similar ao que foi realizado no item 3.2. A matéria prima utilizada como substrato, o micro-organismo, preparo do inóculo, esterilização, correção da umidade do leito e as demais condições de processo (volume de água de maceração de milho, volume de enzimas e concentração de farelo de soja) foram convertidos para um processo de maior escala. Desta maneira, não será descrito novamente nesta seção as atividades referentes a estes procedimentos.

Os ensaios de aumento de escala foram realizados em um reator de aço inoxidável de 5 L. O processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido foi realizado durante 24 horas a uma temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, mantida através de um banho termoestático que foi conectado a camisa do reator conforme apresenta o esquema da Figura 3.3.1.



Figura 3.3.1 - Unidade experimental utilizada para o aumento de escala.

Nesta etapa do processo, foi realizado um aumento de dez vezes na massa de substrato utilizado referente ao processo realizado em frascos de 600 mL. Sendo assim, em cada processo de fermentação em batelada, foram utilizados mil gramas de substrato (farelo de arroz e casca de arroz) em proporções definidas conforme apresentado na seção anterior. Nesta etapa, além das variáveis que se mostraram significativas no processo em escala de bancada (concentração de substrato e umidade) mais uma variável foi adicionada à análise, o volume de inóculo. A inclusão desta variável nesta etapa da análise foi realizada por consequência do aumento de escala do processo onde a dissipação de calor, por exemplo, se torna mais relevante que em um processo em escala de bancada, onde o diâmetro e a altura do leito possuem dimensões menores. Por esta razão, decidiu-se incluir a variável volume de inóculo na análise. Foram realizados dezessete ensaios conforme o DCCR apresentado na Tabela 3.4.1.

Tabela 3.4.1 – Níveis codificados para o DCCR no processo de aumento de escala.

Parâmetros	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
S (F/C)	415/585	500/500	625/375	700/300	835/165
I (%)	1,6	5	10	15	18,4
U (%)	39,8	50	65	80	90,2

Onde: S (F/C) é a massa de farelo e casca de arroz (g/g), I é o volume de inoculo (%v/p) e U é o teor de umidade do meio (%). Fonte: Autor (2015).

As análises referentes aos resultados do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foram realizadas através da metodologia de superfície de resposta. As regiões formadas através das superfícies de contorno demonstram uma região ótima de experimentação, ratificando a escolha do pesquisador pela faixa de investigação. Por fim, uma análise cinética do processo foi realizada para validar a produção de etanol por sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido. Da mesma forma, a análise de concentração de glicose presente no processo foi realizada através do método DNS (Miller, 1959). Da mesma forma que na escala de bancada, os resíduos e materiais utilizados no processo de fermentação retornam para a etapa de esterilização, sendo os resíduos destinados para tratamento e destinação final ambientalmente correta.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da extração de etanol

O estudo da extração de etanol foi realizado a partir da variação dos principais parâmetros envolvidos no processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido, tais como umidade do meio, temperatura, razão sólido líquido, agitação e concentração de etanol. Como se pode notar, parâmetros como umidade e concentração de etanol são determinantes para o processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido, afetando tanto a produção quanto a extração de etanol. Por sua vez, parâmetros como agitação, razão sólido líquido e temperatura são importantes para o processo de extração de etanol. Desta maneira, os resultados desta seção serão apresentados separadamente, sendo primeiramente apresentado a influência dos parâmetros de fermentação na recuperação de etanol e, posteriormente a influência dos parâmetros de extração na recuperação de etanol.

4.1.1 Influência dos parâmetros de fermentação na recuperação do etanol

Os resultados a respeito da recuperação de etanol para diferentes valores de umidade do bagaço de cana de açúcar fermentado estão apresentados na Tabela 4.1.1.

Tabela 4.1.1 - Influência da umidade na recuperação de etanol do bagaço de cana de açúcar.

Ensaio	Umidade(%)	Etanol recuperado(%)
1	50	57,6
2	60	61,8
3	70	67,5
4	80	74,3

Variáveis fixadas: 30°C, razão sólido líquido de 0.1 %p/p, agitação de 100 rpm e concentração inicial de etanol de 10% p/p.

Os resultados apresentados na Tabela 4.1.1 estão demonstrando que para valores altos de umidade a recuperação é mais eficiente, uma vez que 74,3% do etanol adicionado ao bagaço de cana de açúcar foi recuperado quando a umidade foi de 80%, enquanto que apenas 57,6% foi recuperado com 50% de umidade. Estes resultados são interessantes no ponto de vista industrial, uma vez que as fermentações com maior umidade são preferíveis para o crescimento do micro-organismo, devido à alta atividade de água dos sólidos. Na prática, os resultados obtidos estão mostrando que será possível se obter uma alta recuperação de etanol em condições experimentais que apresentam boas características para o crescimento do micro-organismo. Para biorreatores de leito fixo, é difícil manter o teor de umidade a um alto nível, devido às perdas por evaporação. Entretanto, o uso de biorreatores rotativos pode ser uma alternativa efetiva, devido à possibilidade de reposição da água evaporada no processo.

Outra variável importante durante a recuperação do etanol através do bagaço de cana de açúcar fermentado é a quantidade de etanol produzido pelo micro-organismo, que pode variar muito no processo fermentativo, dependendo das condições experimentais utilizadas. Com este propósito, a Tabela 4.1.2 apresenta os resultados a respeito da recuperação de etanol a diferentes concentrações iniciais de etanol no meio.

Tabela 4.1.2 - Influência da concentração inicial de etanol na recuperação a partir do bagaço de cana de açúcar.

Ensaio	Concentração inicial de etanol (%p/p)	Etanol recuperado (%)
1	5	67,3
2	10	61,4
3	15	60,9
4	20	56,6

Variáveis fixadas: 30°C, razão sólido líquido de 0.1% p/p, agitação de 100 rpm e umidade de 60%.

A eficiência de recuperação decresceu conforme a quantidade de etanol foi aumentando no meio. Para efeito de comparação, a quantidade de etanol recuperado quando a concentração inicial foi de 5% p/p foi em torno de 20% maior do que quando a concentração

inicial foi de 20%p/p. Sendo assim, os resultados estão indicando que a recuperação de etanol irá diminuir para altas produções de etanol no meio.

4.1.2 Influência dos parâmetros de extração na recuperação de etanol

A tabela 4.1.3 apresenta os resultados expressando o efeito da razão sólido líquido na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar fermentado

Tabela 4.1.3 - Influência da razão sólido líquido na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

Ensaio	Razão sólido líquido (%p/p)	Etanol recuperado (%)
1	0,1	23,8
2	0,2	45,5
3	0,3	61,4
4	0,4	81,3

Variáveis fixadas: 30°C, concentração inicial de etanol 10%p/p, agitação de 100 rpm e umidade de 60%.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 4.1.3 pode-se observar que com o aumento da razão sólido líquido foi verificado um significativo aumento na quantidade de etanol recuperado, atingindo 81,3% de recuperação para uma razão sólido líquido de 0,4% p/p. Esses resultados também são atrativos do ponto de vista industrial uma vez que um volume menor de água é utilizado para a extração do etanol, resultando em um caldo mais concentrado, reduzindo os custos energéticos na destilação e no tratamento da água residual. Os resultados apresentados na Tabela 4.1.3 estão mostrando uma vantagem importante do processo de fermentação em estado sólido que é a possibilidade de ajustar a quantidade de

água para obter um caldo mais concentrado (MARTINS *et al.*, 2011). Este ponto deve ser considerado na análise de viabilidade econômica de uma planta industrial para a produção de etanol por fermentação em estado sólido.

A Tabela 4.1.4 apresenta os resultados a respeito da influencia da temperatura na extração do etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

Tabela 4.1.4 - Influência da temperatura na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

Ensaio	Temperatura (°C)	Etanol recuperado (%)
1	30	61,4
2	35	58,8
3	40	59,6

Variáveis fixadas: concentração inicial de etanol 10%p/p, agitação de 100 rpm, razão sólido líquido de 0,1%p/p e umidade de 60%.

De uma maneira geral, a temperatura não apresenta alterações significativas na recuperação de etanol. Na avaliação realizada a baixa temperatura (30°C) foi apresentado a maior recuperação de etanol, em torno de 61,4%. Este resultado foi possível pelo fato do etanol ser muito solúvel em água, de uma maneira que baixa quantidade de água é suficiente para solubilizar a maior parte do etanol presente. Obviamente, a matriz sólida é complexa e parte do etanol pode ser adsorvida na estrutura interna, levando ao decaimento da eficiência de recuperação. Na prática, o resultado obtido é desejável, por que a extração pode ser realizada em temperaturas consideradas como temperatura ambiente (25°C), sem a necessidade de usar energia para ajustar a temperatura no processo de extração.

Por fim, a Tabela 4.1.5 apresenta os resultados expressando o efeito da agitação na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

Tabela 4.1.5 - Influência da agitação na recuperação de etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

Ensaio	Agitação (rpm)	Etanol recuperado (%)
1	50	61,1
2	100	61,4
3	150	63,8
4	180	54,4

Variáveis fixadas: 30°C, concentração inicial de etanol de 10% p/p, agitação de 100 rpm, razão sólido líquido de 0,1% p/p e umidade de 60%.

Os resultados demonstraram que não há alterações significativas na eficiência de recuperação de etanol para faixa de agitação de 50 a 150 rpm. Entretanto, para agitação de 180 rpm, foi verificado um decréscimo de 15% na eficiência provavelmente devido a evaporação do etanol durante a extração. É importante enfatizar que agitações mais brandas são suficientes para recuperar em torno de 60% de todo etanol adicionado.

Após análise dos resultados obtidos, pode-se observar que as melhores condições para a recuperação de etanol foram: concentração inicial de etanol 10% p/p, razão sólido líquido 0,4% p/p, agitação de 100 rpm, teor de umidade de 60% e temperatura de 30°C. Nesta condição, a recuperação de etanol atingiu uma eficiência de 81,3%. Esses resultados podem ser aprimorados se a agitação e o teor de umidade forem aumentados, como pode ser observado na influência do teor da umidade e da agitação.

4.2 Sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido

A Tabela 4.2.1 apresenta os resultados da produção de etanol obtidos através da análise estatística de 19 ensaios de um planejamento experimental Plackett & Burman (PB16), após 24 horas de fermentação.

Tabela 4.2.1 - Matriz do PB16 para avaliar a influência dos parâmetros na produção de etanol.

T	S	I	U	FS	AMM	A	C	E
40(1)	50/50(-1)	5(-1)	60(-1)	15(1)	5(-1)	0,2(-1)	0,6(1)	47,44
40(1)	75/25(1)	5(-1)	60(-1)	5(-1)	15(1)	0,2(-1)	0,2(-1)	17,69
40(1)	75/25(1)	15(1)	60(-1)	5(-1)	5(-1)	0,6(1)	0,2(-1)	29,51
40(1)	75/25(1)	15(1)	80(1)	5(-1)	5(-1)	0,2(-1)	0,6(1)	26,78
30(-1)	75/25(1)	15(1)	80(1)	15(1)	5(-1)	0,2(-1)	0,2(-1)	32,31
40(1)	50/50(-1)	15(1)	80(1)	15(1)	15(1)	0,2(-1)	0,2(-1)	44,33
30(-1)	75/25(1)	5(-1)	80(1)	15(1)	15(1)	0,6(1)	0,2(-1)	31,78
40(1)	50/50(-1)	15(1)	60(-1)	15(1)	15(1)	0,6(1)	0,6(1)	147,19
40(1)	75/25(1)	5(-1)	80(1)	5(-1)	15(1)	0,6(1)	0,6(1)	14,72
30(-1)	75/25(1)	15(1)	60(-1)	15(1)	5(-1)	0,6(1)	0,6(1)	93,39
30(-1)	50/50(-1)	15(1)	80(1)	5(-1)	15(1)	0,2(-1)	0,6(1)	35,71
40(1)	50/50(-1)	5(-1)	80(1)	15(1)	5(-1)	0,6(1)	0,2(-1)	21,68
30(-1)	75/25(1)	5(-1)	60(-1)	15(1)	15(1)	0,2(-1)	0,6(1)	43,36
30(-1)	50/50(-1)	15(1)	60(-1)	5(-1)	15(1)	0,6(1)	0,2(-1)	99,71
30(-1)	50/50(-1)	5(-1)	80(1)	5(-1)	5(-1)	0,6(1)	0,6(1)	110,07
30(-1)	50/50(-1)	5(-1)	60(-1)	5(-1)	5(-1)	0,2(-1)	0,6(1)	47,19
35(0)	62,5/37,5(0)	10(0)	70(0)	10(0)	10(0)	0,4(0)	0,4(0)	94,92
35(0)	62,5/37,5(0)	10(0)	70(0)	10(0)	10(0)	0,4(0)	0,4(0)	96,69
35(0)	62,5/37,5(0)	10(0)	70(0)	10(0)	10(0)	0,4(0)	0,4(0)	89,00

Onde: T é a temperatura (°C), S é a massa de substrato (g farelo/g casca de arroz), I é o volume de inóculo (%v/p), U é o teor de umidade no meio, FS é a concentração de farelo de soja (g/g), AMM é a concentração de água de maceração de milho (%v/p), A é a concentração de amilase (%v/p), C é a concentração de celulase (%v/p) e E é a concentração de Etanol (g EtOH/ kg Substrato).

O planejamento experimental Plackett & Burman permite avaliar apenas a influência linear dos parâmetros frente ao processo. (PLACKETT; BURMAN, 1946) Através da avaliação da Tabela 4.2.1, que apresenta resultados da concentração de etanol variando na faixa de 14,72 a 147,19 g EtOH/ kg substrato, sugere-se que tal variabilidade dos resultados implica na significância de algumas variáveis independentes no processo de fermentação. Sendo assim, com intuito de ratificar esta afirmação, foi realizado uma análise estatística utilizando o software STATISCA 7.0, conforme pode ser observado na Tabela 4.2.2.

Tabela 4.2.2 - Análise dos efeitos das variáveis independentes do PB16 na produção de etanol.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	t(10)	p
Média	0,43	0,04	9,61	≤0,0001
T	-0,02	0,09	-0,43	0,67
S*	-0,13	0,10	-2,75	0,02
I	0,09	0,09	1,86	0,09
U*	-0,13	0,10	-2,65	0,02
FS	0,04	0,09	0,86	0,40
AMM	0,05	0,09	1,07	0,39
A*	0,13	0,10	2,75	0,02
C	0,07	0,10	1,53	0,15

Onde: parâmetros marcado com “*” foram significativos de acordo com a análise estatística.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.2.2, se observa que o tamanho do inoculo, a concentração de celulase, de água de maceração de milho, farelo de soja e a temperatura não apresentam influência significativa no processo de fermentação em estado sólido para a produção de etanol de segunda geração. Por outro lado, a concentração de substrato, o teor de umidade foram negativos e significativos ($p < 0,05$), indicando que um aumento na concentração de substrato e no teor de umidade levam a uma redução na produção de etanol. No caso do teor de umidade, a significância da mesma no processo é de suma importância, tendo em vista que sem o mínimo de água livre no sistema, não haverá crescimento microbiano e, conseqüentemente, não haverá processo de fermentação. Por sua vez, a concentração de substrato se mostra significativa, pois se trata da maior fonte de carbono do processo, sendo convertido em glicose e posteriormente em etanol através da ação da *Sacharomyces cerevisiae*. Todavia, caso seja exposta uma quantidade exagerada de substrato no meio, haverá inibição pelo substrato e o processo não irá se desenvolver. Já para a concentração do complexo enzimático amilolítico, se observou influência significativa e positiva para o processo de produção de etanol, sugerindo que um aumento na concentração do complexo acarretaria no aumento da produção de etanol. A significância do complexo amilolítico é dada pela ação hidrolítica que o mesmo desempenha, convertendo longas cadeias de carbono em moléculas de glicose, monômero ideal para o consumo da *Sacharomyces cerevisiae*, portanto, quanto mais enzimas presentes, maior seria a taxa de conversão de celulose em glicose e, conseqüentemente, maior seria a produção de etanol (FERREIRA *et al.*, 2009).

A fim de maximizar o processo de produção de etanol por fermentação em estado sólido, a metodologia de superfície de resposta (RSM) foi empregada para maximizar a produção de etanol. Duas variáveis, umidade e concentração de substrato foram avaliadas no Delineamento Composto Central Rotacional (CCRD), conforme determinado no planejamento anterior (PB16). A análise da influência do complexo amilolítico foi realizada em 5 ensaios separados, devido a fatores econômicos. Doze ensaios foram realizados para determinar a região ótima para a produção máxima de etanol e os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.3.

Tabela 4.2.3 - Matriz CCRD e resultados da produção de etanol (g EtOH/kg S).

Ensaio	S (F/C)	U (%)	EtOH (g/kg S)
1	50/50(-1)	65(-1)	96,79
2	50/50(-1)	85(1)	82,40
3	75/25 (1)	65(-1)	133,42
4	75/25 (1)	85(1)	111,18
5	62,5/37,5(0)	75(0)	87,64
6	62,5/37,5(0)	75(0)	112,49
7	44,9/55,1(-1,41)	75(0)	92,87
8	80,1/19,9(1,41)	75(0)	90,25
9	62,5/37,5(0)	60,9(-1,41)	107,26
10	62,5/37,5(0)	89,1(1,41)	136,06
11	62,5/37,5(0)	75(0)	125,57
12	62,5/37,5(0)	75(0)	143,88

Onde: S (F/C) é a proporção farelo/casca de arroz (g/g) e U é o teor de umidade no meio (%). Variáveis fixadas: T=37 °C, AMM= 5%, FS= 5%, Celulase= 0,2% v/p, Amilase= 0,6% v/p.

Conforme pode ser observado na Tabela 4.2.3, a produção de etanol ficou induzida na faixa de 82,40 a 143,88 g EtOH/ kg substrato, com produção máxima obtida no ensaio 12. Os resultados obtidos através da Tabela 4.2.3 foram utilizados para a construção de um modelo quadrático expressando a produtividade de etanol em função das variáveis independentes que se mostraram significativas após análise estatística utilizando o software STATISTICA 7.0, conforme os efeitos podem ser conferidos na Tabela 4.2.4.

Tabela 4.2.4 - Efeito estimado, coeficiente de regressão e valores de t e p para o CCRD.

Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	t	p
Média	1,02	0,05	20,35	≤0,0001
S (L)	0,05	0,07	1,65	0,14
S (Q)*	-0,14	0,08	-3,53	0,01
U (L)	-0,06	0,07	-1,72	0,13
U (Q)*	-0,11	0,08	-2,96	0,02
SxU	-0,01	0,10	-0,29	0,77

Onde: parâmetros marcado com “*” foram significativos de acordo com a análise estatística

Os resultados apresentados na Tabela 4.2.4 foram usados para construir um modelo matemático expressando a produção de etanol em função das variáveis independentes. A Equação 4.2 mostra os termos significantes do modelo ($p < 0,05$).

$$EtOH_{\left(\frac{\%p}{p}\right)} = 1,02 - 0,14S^2 - 0,11U^2 \quad (4.2)$$

Onde $EtOH_{\left(\frac{\%p}{p}\right)}$ é a concentração de etanol no meio fermentativo (%p/p), S é o valor codificado para a concentração de substrato (%p/p) e U o valor codificado para o teor de umidade no meio, respectivamente. Os termos significativos do modelo podem ser usados para discutir os efeitos de cada termo na produção de etanol. Ambos os termos quadráticos para a concentração de substrato e umidade foram estatisticamente significantes, mas o efeito da proporção de substrato foi mais acentuado do que o efeito da umidade. Os termos quadráticos tanto para a proporção de substrato como para a umidade indicam um ponto ótimo no sistema que é similar para ambas variáveis.

O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA), através do teste F e do coeficiente de regressão linear (R^2). Primeiramente, através da análise do coeficiente de regressão linear se pode afirmar que o modelo apresentou um ajuste razoável para a predição dos dados de produção de etanol, atingindo um valor de 0,79737. Por outro lado, o teste F ratificou a predição do modelo, apresentando um valor de F calculado 7 vezes maior que o F tabelado. Desta maneira, segundo apresentou Biazus (2006), para que o modelo seja considerado satisfatório, o valor do F calculado deve ser no mínimo 4 vezes maior que o valor

de F tabelado.

Sendo assim, o modelo apresentado foi utilizado para prever a produção de etanol no processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido. O modelo validado foi utilizado para otimizar a produção de etanol conforme pode ser observado na Figura 4.2.2.

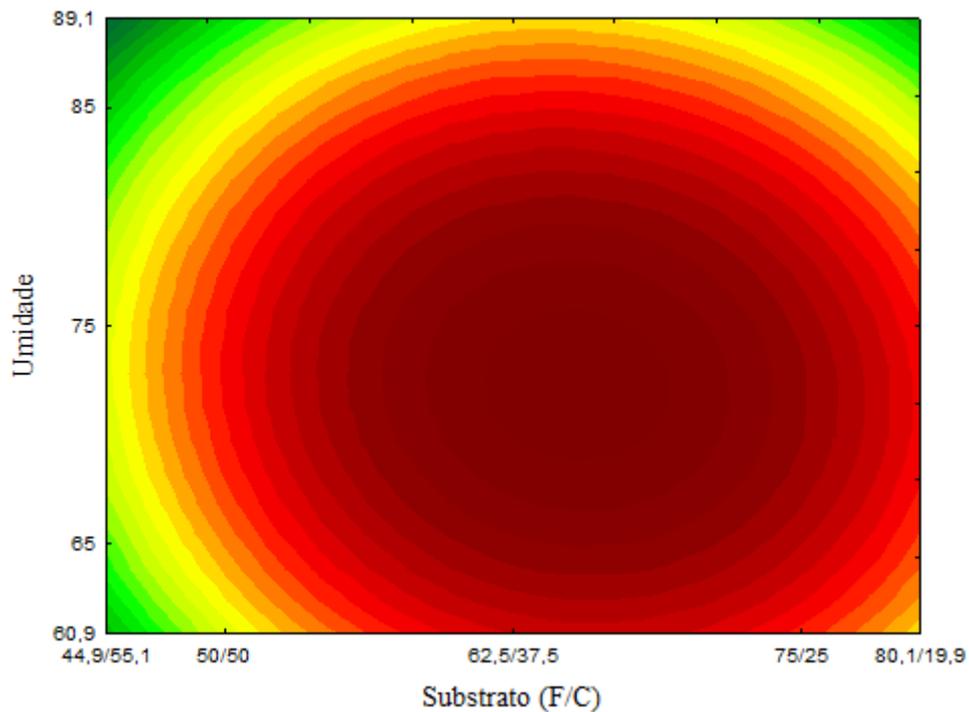


Figura 4.2.2 - Superfície de contorno do rendimento de etanol conforme delineamento composto central rotacional.

A Figura 4.2.2 apresenta a influência da umidade e da proporção de substrato na produção de etanol por sacarificação e fermentação em estado sólido simultânea. As maiores produções de etanol foram obtidas em uma faixa de umidade variando de 60 a 85% e para a proporção de substrato variando de 50 g farelo/50 g casca a 75 g farelo/25 g casca. O modelo permite afirmar que existe uma região ótima na superfície de contorno, além disso, é possível

afirmar que a condição otimizada foi encontrada para umidade de 75% e proporção de substrato de 62,5 g farelo/37,5g casca. Nesta condição, a produção máxima de etanol foi em torno de 143,88 g EtOH/ kg substrato. Depois de realizada a otimização do processo de produção de etanol com base nas duas variáveis estatisticamente significativas, uma análise da influência da enzima amilase, que também se mostrou estatisticamente significativa no processo de produção de etanol foi realizado de acordo com a Tabela 4.2.5. Neste caso, cinco ensaios foram realizados com concentrações de enzima variando de 0 a 2% v/m.

Tabela 4.2.5 - Análise da influência da enzima Amilase na produção de etanol.

Ensaio	S (F/C)	U (%)	A(%)	EtOH (g/kg S)
1	62,5/37,5	75	0	35,32
2	62,5/37,5	75	0,5	109,87
3	62,5/37,5	75	1,0	125,57
4	62,5/37,5	75	1,5	136,03
5	62,5/37,5	75	2,0	138,65

Onde: S (F/C) é a proporção de farelo e casca de arroz (g/g), U é o teor de umidade (%) e A é a concentração de amilase (% v/p).Fonte: Autor (2015).

Conforme se observa na Tabela 4.2.5, a produção de etanol é diretamente proporcional ao aumento da concentração da enzima amilase no meio. O comportamento apresentado é o esperado frente ao mecanismo que a enzima desenvolve no processo, convertendo longas cadeias de dissacarídeos em glicose, monômero que é então convertido em etanol através da ação da *Sacharomyces cerevisiae*. A escolha por realizar este passo do planejamento separado se deve basicamente ao fator econômico, pois hoje em dia adquirir enzimas é uma ação bastante dispendiosa mesmo com os avanços na sua produção. Como não tínhamos um volume de enzimas suficientes até o término desta dissertação, optou-se por reduzir ao máximo o uso das mesmas a fim de concluir o restante do trabalho. Desta maneira, avaliando os resultados encontrados na Tabela 4.2.5 optou-se por utilizar um volume médio de enzima, como encontrado no ensaio 3, que obteve uma produção relevante de etanol frente aos demais experimentos. Comparando o resultado obtido no ensaio 3 com o resultado do ensaio 2, nota-se que há um aumento plausível na produção de etanol. Da mesma forma, avaliando as

produções dos ensaios 4 e 5, observa-se que a produção não atingiu valores muito mais relevantes que no ensaio 3. Diante deste fato, optou-se por fixar o volume de enzima utilizado no ensaio 3, que obteve uma produção relevante e utilizou um volume de enzima economicamente dentro das limitações encontradas para a realização deste trabalho.

Baseado na condição ótima encontrada após a análise da Figura 4.2.2e da Tabela 4.2.5, foi realizado um estudo cinético para o processo, onde se avaliou a produção de etanol e o consumo do substrato na forma de açúcares redutores, conforme é apresentado na Figura 4.2.3.

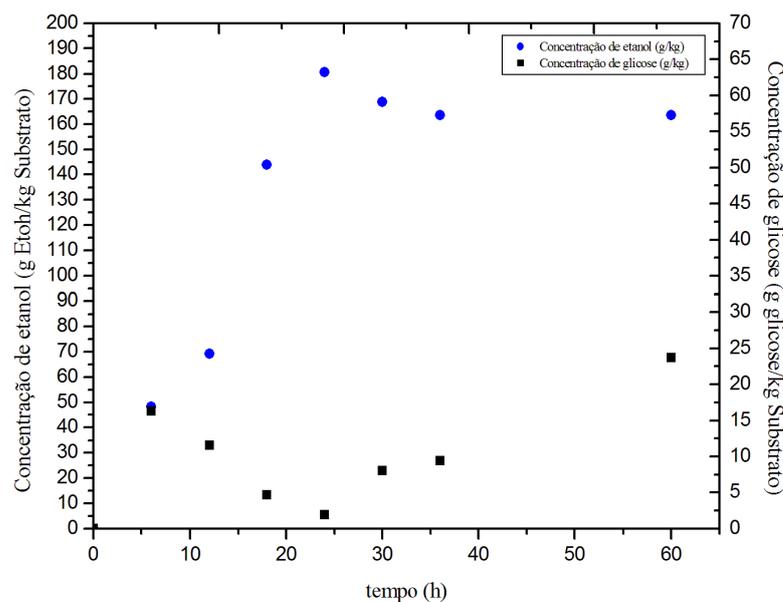


Figura 4.2.3 - Cinética do processo nas condições ótimas para o processo em escala de bancada.

O comportamento do processo de sacarificação e fermentação simultâneo apresentado na Figura 4.2.3 mostra que a produção de etanol é inversamente proporcional ao consumo de

substrato no meio. Tal comportamento é padrão em processos fermentativos onde, por lógica, o micro-organismo utilizado no processo consome o substrato convertendo-o no produto de interesse e mais alguns subprodutos. No caso da *Saccharomyces cerevisiae* o produto de interesse é o etanol e o subproduto é basicamente dióxido de carbono. Analisando a Figura 4.2.3 observa-se que a produção máxima de etanol obtida foi no tempo de 24 horas, mesmo tempo em que o consumo máximo do substrato foi encontrado. Neste ponto a velocidade de obtenção do produto é máxima ($1,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), consumindo praticamente todo o substrato presente no meio e acarretando em uma alta conversão do mesmo no produto final de interesse. Após 24 horas observa-se um decaimento na produção de etanol que pode ser atribuída à perda de etanol para o meio, através da sua evaporação, que é consequência do calor metabólico gerado pelo micro-organismo ou pela adsorção do etanol através dos poros do farelo e da casca de arroz. Já para o substrato nota-se um aumento na sua concentração após 24 horas de processo, podendo ser atribuído pela continuidade da ação catalítica dos dois complexos enzimáticos presentes no meio fermentativo e através da desativação do micro-organismo no processo, fazendo com que o consumo do substrato seja reduzido e assim aumente a concentração do mesmo no meio fermentativo.

De maneira adversa aos processos de hidrólise e fermentação tradicionais, o processo de sacarificação e fermentação simultânea deve operar com temperaturas e tempos que atendam ambos os agentes atuantes no meio, neste caso, o micro-organismo e os complexos enzimáticos. O comportamento apresentado após 24 horas de processo esboça perfeitamente a dificuldade encontrada no processo. Neste momento e nas condições propostas ($35,8 \text{ }^\circ\text{C}$ e 24 horas) o micro-organismo se encontra em condições ótimas para seu desenvolvimento no meio fermentativo, diferente dos complexos enzimáticos, que têm sua atividade catalítica máxima em temperaturas mais elevadas, em torno de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme Singh *et al* (2014), que realizaram a hidrólise enzimática da casca de arroz utilizando a mesma temperatura. Da mesma maneira, os tempos dos processos diferem entre si, onde para o processo de fermentação a produção máxima é alcançada em 24 horas e para a hidrólise geralmente o tempo de processo é mais elevado, superando às 24 horas do processo fermentativo. Assim, como mostrado na Figura 4.2.3, os complexos enzimáticos levarão mais tempo para realizar a hidrólise, fazendo com que ocorra o decaimento da concentração de substrato no meio através do seu consumo pelo micro-organismo até o tempo de 24 horas e posteriormente um aumento de sua concentração como consequência da continuidade da ação catalítica das enzimas presentes no processo.

4.3 Aumento de Escala

Com base nos ensaios realizados em escala de bancada e com a otimização realizada para a produção de etanol, foi proposto um aumento de escala do processo através da utilização de um reator em escala piloto de 5 L. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com 17 ensaios, foi utilizado para avaliar 3 parâmetros do processo. A Tabela 4.3.1 apresenta a matriz do planejamento utilizado (DCCR) e os resultados obtidos para a produção de etanol

Tabela 4.3.1 - Matriz do planejamento DCCR e resultados da produção de etanol para o aumento de escala.

Ensaio	S	I(%)	U(%)	EtOH(%g/kg)
1	500/500(-1)	5(-1)	50(-1)	88,56
2	500/500(-1)	5(-1)	80(1)	86,55
3	500/500(-1)	15(1)	50(-1)	91,92
4	500/500(-1)	15(1)	80(1)	89,91
5	750/250(1)	5(-1)	50(-1)	119,43
6	750/250(1)	5(-1)	80(1)	111,38
7	750/250(1)	15(1)	50(-1)	118,09
8	750/250(1)	15(1)	80(1)	123,45
9	415/385(-1,68)	10(0)	65(0)	88,56
10	835/165(1,68)	10(0)	65(0)	122,78
11	625/375(0)	1,6(-1,68)	65(0)	110,03
12	625/375(0)	18,4(1,68)	65(0)	108,02
13	625/375(0)	10(0)	39,8(-1,68)	99,30
14	625/375(0)	10(0)	90,2(1,68)	111,38
15	625/375(0)	10(0)	65(0)	128,15
16	625/375(0)	10(0)	65(0)	129,49
17	625/375(0)	10(0)	65(0)	126,81

Onde: S é a proporção de farelo e casca de arroz (g/g), I é o volume de inoculo (%) e U é a umidade no meio (%). Parâmetros fixado: Temperatura (35 °C), % AMM (5% v/p), Farelo de soja (% p/p), % Amilase (1% v/p) e % Celulase (0,6% v/p). Fonte: Autor (2015).

De acordo com os resultados encontrados na Tabela 4.3.1 pode-se observar que a produção de etanol ficou na faixa de 86,55 a 129,49 g EtOH/ kg substrato, tendo sua produção máxima encontrada no ensaio 16. Os resultados apresentados na Tabela 4.3.1 foram utilizados

para a construção de um modelo quadrático expressando a produtividade de etanol em escala piloto em função das variáveis que demonstraram grau de significância de 95%, conforme análise realizada no software estatístico STATISICA 7.0 apresentada na Tabela 4.3.2.

Tabela 4.3.2 - Coeficiente de regressão para o delineamento composto central rotacional.

Fatores	Coefficientes	Erro Padrão	t (7)	p
Média	1,91	0,04	43,18	≤0,0001
S(L)*	0,19	0,04	9,07	≤0,0001
S(Q)*	-0,12	0,04	-5,42	≤0,0001
I%(L)	0,01	0,04	0,73	0,48
I%(Q)*	-0,10	0,04	-4,65	≤0,0001
U%(L)	0,01	0,04	0,71	0,49
U%(Q)*	-0,12	0,04	-5,50	≤0,0001
S(L)xI(L)	0,007	0,05	0,27	0,79
S(L)xU(L)	0,002	0,05	0,09	0,93
I(L)xU(L)	0,02	0,05	0,92	0,39

Onde: parâmetros marcado com “*” foram significativos de acordo com a análise estatística.

Os resultados apresentados na Tabela 4.3.2 foram usados para construir um modelo matemático expressando a produção de etanol em função das variáveis independentes. A Equação 4.3 mostra os termos significantes do modelo ($p < 0,05$).

$$EtOH_{\left(\frac{\%p}{p}\right)} = 1,91 + 0,18S - 0,12S^2 - 0,10I^2 - 0,12U^2 \quad (4.3)$$

Onde $EtOH_{\left(\frac{\%p}{p}\right)}$ é a concentração de etanol no meio fermentativo (% p/p), S é o valor codificado para a concentração de substrato (% de farelo de arroz/casca de arroz), U é o valor codificado para o teor de umidade do meio e I é o valor codificado para a percentagem de inóculo, respectivamente. Os termos significantes do modelo podem ser usados pra discutir os efeitos de cada termo na produção de etanol. O termo linear da concentração de substrato foi estatisticamente significativo e apresentou um valor positivo, indicando que o aumento da

concentração de farelo de arroz pode levar ao aumento da quantidade de etanol produzido. Por outro lado, o termo quadrático para substrato foi estatisticamente significativo e apresentou valor negativo, o que indica a presença de um ponto de máximo na faixa estudada. Em outras palavras, o aumento da concentração de substrato levará à um aumento da quantidade de etanol produzida somente até um determinado valor. Os demais termos quadráticos (umidade e inoculo) foram estatisticamente significativos e apresentaram valores negativos similares ao valor para concentração de substrato.

As condições operacionais que maximizam a produção de etanol podem ser obtidas a partir da aplicação do modelo para a construção de curvas de contorno e/ou superfícies de resposta. Por esta razão, o modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA), através do teste F e do coeficiente de regressão linear (R^2). Primeiramente, através da análise do coeficiente de regressão linear se pode afirmar que o modelo apresentou um ajuste bom para a predição dos dados de produção de etanol, atingindo um valor de 0,9501. Por outro lado, o teste F ratificou a predição do modelo, apresentando um valor de F calculado 13 vezes maior que o F tabelado. Desta maneira, segundo apresentou Biazus (2006) em seu trabalho, para que o modelo seja considerado satisfatório, o valor do F calculado deve ser no mínimo 4 vezes maior que o valor de F tabelado.

Sendo assim, o modelo apresentado será utilizado para prever a produção de etanol no processo de sacarificação e fermentação em estado sólido simultâneo. O modelo validado foi utilizado para otimizar a produção de etanol conforme pode ser observado na Figura 4.3.1.

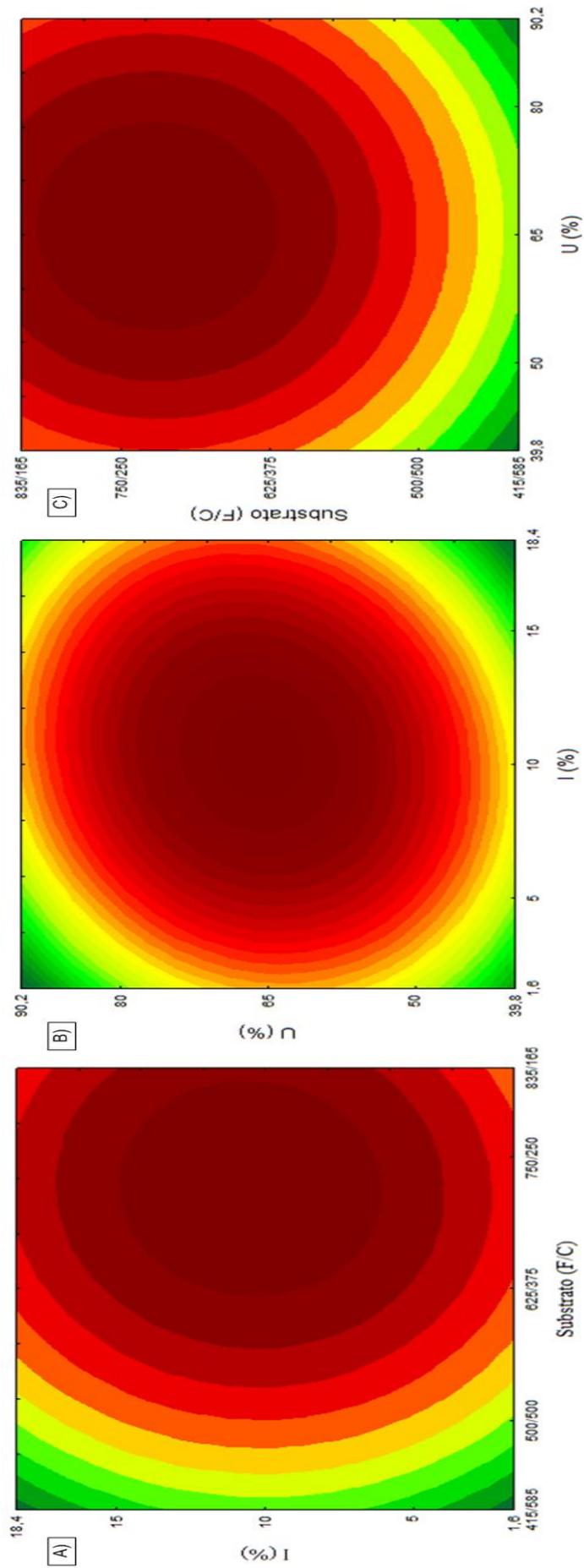


Figura 4.3.1 - Superfícies de contorno para o aumento de escala na produção de etanol. a) Substrato versus Inóculo; b) Inóculo versus Umidade; c) Umidade versus Substrato.

A Figura 4.3.1 (a) apresenta a influência da proporção de substrato e da umidade na produção de etanol por sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido. Conforme pode se observar, existe uma região ótima para a produção de etanol quando avaliado esses dois parâmetros, compreendidas na faixa de 625/375 (g farelo/g casca) a 835/165 (g farelo/g casca) para a proporção de substrato e 1,6% a 18,4% para o volume de inóculo. Da mesma forma, a Figura 4.3.1 (b) apresenta a influência da do volume de inóculo e do teor de umidade na produção de etanol, onde a máxima produção de etanol é encontrada na faixa de 1,6% a 18,4% para o volume de inoculo e de 50 a 80% para o teor de umidade. Por fim, a Figura 4.3.1 (c) mostra o impacto que os parâmetros umidade e proporção de substrato impõe no processo de produção de etanol por sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido. As faixas ótimas para a produção de etanol neste caso foram de 1,6% a 18,4% para o volume de inoculo e de 625/375 (g farelo/g casca) a 835/165 (g farelo/g casca) para a proporção de substrato. Desta forma, o modelo permite afirmar que existe uma região ótima nas superfícies de contorno, além disso, é possível afirmar que a condição otimizada foi encontrada para umidade de 65%, proporção de substrato de 625/375 (g farelo/g casca) e 10% de inoculo. Nesta condição, a produção máxima de etanol foi em torno de 129,49 g EtOH/ kg substrato. Baseado na condição ótima encontrada na Figura 4.3.1 foi realizado um estudo cinético para o processo, onde se avaliou a produção de etanol e o consumo do substrato na forma de açúcares redutores, conforme é apresentado na Figura 4.3.2.

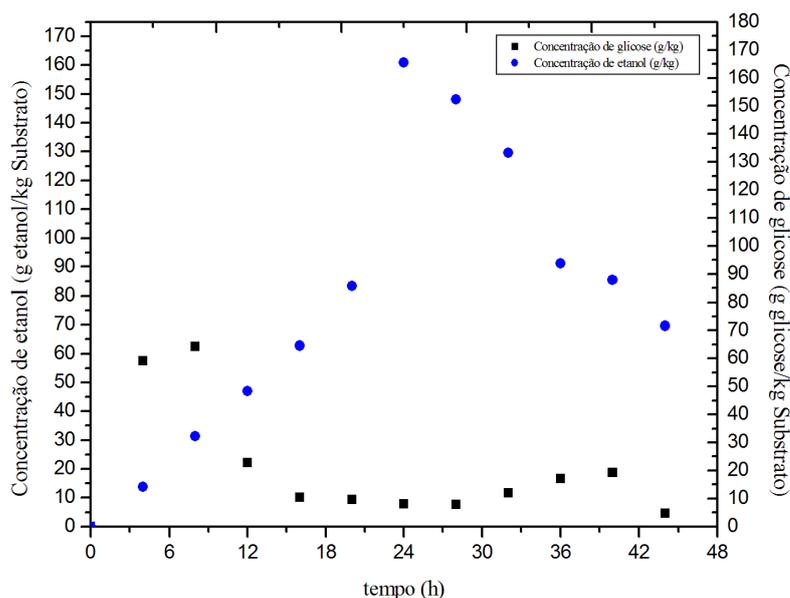


Figura 4.3.2 - Cinética do processo nas condições ótimas determinadas para o aumento de escala.

O comportamento do processo de sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido apresentado na Figura 4.3.2 mostra que a produção de etanol é inversamente proporcional ao consumo de substrato no meio, seguindo o comportamento apresentado no processo realizado em escala de bancada. Sendo assim, conforme já foi discutido anteriormente, o comportamento encontrado no processo de aumento de escala é padrão em processos fermentativos e segue o mesmo perfil do encontrado em escala menor. Por lógica, o micro-organismo utilizado no processo consome o substrato convertendo-o em etanol e dióxido de carbono. Portanto, observa-se que a produção máxima de etanol obtida foi no tempo de 24 horas, mesmo tempo em que o consumo máximo do substrato foi encontrado. Neste ponto a velocidade de obtenção do produto é máxima ($1,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), consumindo praticamente todo o substrato presente no meio. Após 24 horas observa-se um decaimento na produção de etanol que pode ser atribuída à perda de etanol para o meio, através da sua evaporação, que é consequência do calor metabólico gerado pelo micro-organismo ou pela adsorção do etanol através dos poros do farelo e da casca de arroz. Já para o substrato nota-se um aumento na sua concentração após 24 horas de processo, podendo ser atribuído pela continuidade da ação catalítica dos dois complexos enzimáticos presentes no meio

Capítulo 4– Resultados e Discussão

fermentativo e através da desativação do micro-organismo no processo, fazendo com que o consumo do substrato seja reduzido e assim aumente a concentração do mesmo no meio fermentativo.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

As conclusões obtidas para cada objetivo abordado neste estudo serão apresentadas a seguir.

5.1 Estudo sobre a extração do etanol

Os estudos envolvendo o processo de extração de etanol foram realizados para propor um processo alternativo para a recuperação de etanol oriundo do processo de fermentação em estado sólido. Com base nos dados obtidos conclui-se que:

- a umidade do meio e razão sólido-líquido demonstrou ser importante no processo de extração, uma vez que no maior teor de umidade investigado (80%) foi encontrada a maior eficiência de recuperação de etanol no meio (74,3%);
- a razão sólido-líquido contribuiu para uma melhora na eficiência de recuperação de etanol (81,3%), sendo responsável por concentrar ou não o produto de interesse;
- o processo pode ser aprimorado com o aumento da agitação e do teor de umidade;
- Os demais parâmetros, tais como temperatura, agitação e concentração inicial de etanol não se mostraram importantes para o processo de extração, não apresentando variação significativa na eficiência de recuperação de etanol;
- a melhor condição de extração do etanol foi para Razão sólido-líquido 0,4% p/p, Temperatura 30 °C, agitação 100 rpm, 60% umidade e 5% de etanol.

5.2 Sacarificação e fermentação simultânea em estado sólido

5.2.1 Escala de bancada

Em relação a análise da produção de etanol em escala de bancada, conclui-se que:

- é possível produzir etanol através do processo de sacarificação e fermentação em estado sólido simultânea;
- de acordo com o PB16: parâmetros como a umidade, proporção de substrato e concentração de amilase são significativas para o processo, com 95% de confiança;
- a otimização realizada (CCRD) apontou que o efeito da proporção de substrato foi mais acentuado do que o efeito da umidade para o processo, indicando uma região ótima para a produção de etanol;
- a melhor condição para a produção de etanol em escala de bancada foi 62,5 g farelo/ 37,5 g casca e 75% de umidade;
- a produção máxima de etanol nestas condições foi de 143,88 g EtOH/ kg S.
- Em relação aos cinco ensaios envolvendo o complexo amiolítico, através de uma avaliação da relação de custo benefício do processo optou-se por utilizar uma concentração de 1% v/p de amilase;
- O estudo cinético realizado mostrou que o processo segue o perfil de comportamento esperados para processos fermentativos, validando a produção de etanol por sacarificação e fermentação em estado sólido simultânea.

5.2.2 Aumento de escala

Baseado nos resultados encontrados nos ensaios realizados em escala de bancada foi proposto um aumento de escala em um reator de 5 L, conclui-se que:

- É possível realizar o processo de aumento de escala para o processo de sacarificação e fermentação em estado sólido simultânea;
- Parâmetros proporção de substrato, volume de inóculo e teor de umidade mostraram-se significativos com 95% de confiança;
- Condição ótima: 625g/375g substrato, 65% Umidade e 10% Inóculo .
- Produção de 129,49 g EtOH/g Substrato
- A cinética de validação mostrou que o perfil apresentando no processo em escala de bancada se manteve no processo de aumento de escala, afirmando a possibilidade da realização do processo em escalas maiores

CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ciente de que o presente trabalho inicia um estudo de produção de etanol por sacarificação e fermentação em estado sólido simultânea e que ainda existe muito trabalho a ser realizado, deixo algumas sugestões para futuros trabalhos, tais como:

- utilização de complexos enzimáticos (xilanase, stargen) diferentes com objetivo de maximizar a eficiência no processo de sacarificação;
- utilização de micro-organismos termotolerantes, na tentativa de sanar a discrepância de temperaturas do processo de sacarificação e fermentação, que é uma característica negativa do processo realizado de maneira simultânea;
- realizar o processo utilizando um reator de tambor rotativo, tentando eliminar as formações das chamadas regiões mortas, que são características em reatores de leito fixo em estado sólido;
- construir uma unidade experimental que desenvolva o processo de fermentação e purificação do produto final de maneira simultânea, através do acoplamento de um processo de purificação junto ao reator utilizado e
- realizar testes em escala piloto industrial, localizada junto a Universidade Federal de Santa Maria.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo N.R., Rocha F., Barros M.A., Fischer J., Filho U.C., Cardoso V.L. Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. *Renewable Energy*, v 57, p 432-435, 2013.

Babu V., Thapliyal A., Patel G.K. *Biofuels Production*. John Wiley & Sons, 2014.

Balat M., Balat H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*, v 86, p 2273–2282, 2009.

Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*, v 52, p 858–875, 2011.

Behera S., Mohanty R.C., Ray R.C. Ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs. *Applied Energy*, v 88, p 212–215, 2011.

Bender J.P., Mazutti M.A., Di Luccio M., Treichel H. Extraction of Inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v 149, p 195–203, 2008.

Biazus J.P.M. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, p 787-792, 2006.

Brethauer S, Wyman C.E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4862-4874, 2010.

Cannel E., Mõo-Young M. Solid State Fermentation systems. *Process Biochemistry*, v 15, p 24-8, 1980.

Cardona C.A., Sanchez O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* v 98, p 2415–2457, 2007.

Cheng J.J., Timilsina G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review, *Renewable Energy*, v 36, p 3541–3549, 2011.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Chen H, Li G. An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal.*, v 74, p 121-126, 2013.

Chiaramonti D. Bioethanol: role and production technologies, in: P. Ranalli (Ed.), *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*, Springer, p 209–251, 2007.

Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB, 2015. Em: www.conab.gov.br

Del Biachi V.L., Moraes I.O, Capalbo D.M.F. Fermentação em estado sólido. Em: *Biotecnologia Industrial*, v 2, 2001.

Durand A., De La Broise D., Blachère H. Laboratory scale bioreactor for solid processes. *Journal of Biotechnology*, v 8, p 59-66, 1988

Ferreira S, Duarte A.P., Ribeiro M.H.L., Queiroz J.A., Domingues F.C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistusladanifer* and *Cytisusstriatus* for bioethanol production. *Biochemistry. Engineering Journal.*, v 45, p 192–200, 2009.

Field C.B., Campbell J.E., Lobell D.B. Biomass energy: the scale of the potential resource. *Trends in Ecology & Evolution*, v 23, p 65–72, 2008.

Frederick W.J., Lien S.J., Courchene C.E., Demartini N.A., Ragauskas A.J., Lisa K. Production of ethanol from carbohydrates from loblolly pine: a technical and economic assessment. *Bioresource Technology*, v 99, p 5051–5057, 2008.

Galbe M., Zacch G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v 108, p 41–65, 2007.

Gaykawad S.S., Zha Y., Punt P.J., van Groenestijn J.W., van der Wielen L.A.M., Straathof A.J.J. Pervaporation of ethanol from lignocellulosic fermentation broth. *Bioresource Technology*, v 129, p 469–476, 2013.

Gnansounou E., Dauriat A., Wyman C.E. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresource Technology*, v 96, p 985–1002, 2005.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Gnansounou E., Dauriat A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. *Bioresource Technology*, v 101, p 4980–4991, 2011.

Granbio, 2014. Em: www.granbio.com.br.

Gregory M.B. Process economic considerations for production of ethanol from biomass feedstocks. *Industrial Biotechnology*, v 2, p 14-20, 2006.

Viikari L., Vehmaanpera J., Koivula A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy*, v 46, p 13-24, 2012.

Gutierrez-Rojas M., Hosn S.A.A, Auria R., Revah S., Favela-Torres E. Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v 31, p 363–369, 1999.

Ho C.Y., Chang J.J., Lee S.C., Chin T.Y., Shih M.C., Li W.H., Huang C.C. Development of cellulosic ethanol production process via co-culturing of artificial cellulosomal *Bacillus* and kefir yeast. *Applied Energy*, v 100, p 27–32, 2012.

Instituto Rio Grandense do Arroz, IRGA, 2015. Em: www.irga.rs.gov.br

Instituto Brasileiro de Geografia e estatística, IBGE, 2015. Em: www.ibge.gov.br

Juliano, B.O. Rice Chemistry and Quality. Island Publishing House, Inc. p 25 – 54, 2003.

Kristensen S.B.P., Birch-Thomsen T., Rasmussen K., Rasmussen L.V., Traoré O. Cassava as an energy crop: A case study of the potential for an expansion of cassava cultivation for bioethanol production in Southern Mali. *Renewable Energy*, v 66, p 381-390, 2014.

Kojima M., Johnson T. Potential for biofuels for transport in developing countries. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Energy Sector Management Assistance Programme Report, October, 2005.

Lennartsson P.R., Erlandsson P., Taherzadeh M.J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, v 165, p 3–8, 2014.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Litch F.O. World Ethanol Markets. The Outlook to 2015. An F.O. Licht Special Report No. 138, 2006.

Luo L., van der Voet E., Huppes G. Biorefining of lignocellulosic feedstock – Technical, economic and environmental considerations. *Bioresource Technology*, v 101, p 5023–5032, 2010.

Lynd P.J. Weimer W.H., van Zyl I.S. Pretorius. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v 66, p 506–577, 2002.

Mccabe W.L., Smith J.C., Harriott P. Unit Operations of Chemical Engineering. Seventh Edition. McGraw – Hill Internacional Edition. New York, 2005.

Magalhães Junior A.M. de; Gomes A. da S.; Santos A. B. dos. Sistema de cultivo de arroz irrigado no Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 270 p. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de produção, v 3.

Maki M., Leung K.T., Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Internecional Journal of Biological sciences*, v 5, p 500-16, 2009.

Malekian F., Rao R.M., Prinyawiwatkul W., Marshall W.E., Windhauser M., Ahmedna M. Lipase and Lipoxygenase Activity, Functionality and Nutrient Losses in Rice Bran During Storage. LSU Ag center, Research & Extension, 2000.

Marques S., Alves L., Roseiro J.C., Gírio F.M. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy*, v 32(5), p 400–406, 2008.

Marangoni, A.G. Enzyme Kinetics: A modern Approach. Wiley & Sons, 2003.

Martins S., Mussatto S.I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C.N., Teixeira J.A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology. Advances*, v 29(3), p 365-73, 2011.

Mazutti M.A., Bender J.P., Treichel H., Di Luccio M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v 39, p 56–59, 2006.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Mielenz J. Ethanol production from biomass: Technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, v 4(3), p 324–329, 2001.

Miller G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Pioneering Research Division, Quartermaster Research and Engineering Center, Natick, Mass, 1959.

Minteer S. *Alcoholic Fuels*, Taylor & Francis, New York, 2006

Mitchell D.A., Krieger N., Stuart D.M., Pandey A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v 35, p 1211 – 1225, 2000

Mitchell D.A., von Meien O.F., Krieger N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v 13, p 137–147, 2003.

Mohan Kumar N.S., Ramasamy R., Manonmani H.K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. Using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v 43, p 150-158, 2013.

Mojovic' L., Nikolic' S., Rakin M., Vukašinovic' M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*,v 85(12–13), p 1750–1755, 2006.

Moo-Young M., Moreira A.R., Tengerdy R.P. Principles of solid-substrate fermentation. In: Smith J.E., Berry D.R., Kristiansen B (eds) *The filamentous fungi*, v 4. Edward Arnold, London, p 117–144, 1983.

Mosier N.S, Ladisch M.R. *Modern Biotechnology: Connecting Innovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2009.

Nikolic' S., Mojovic' L., Rakin M., Pejin D. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*, v 88(9), p 1602–1607, 2009.

Nikolic' S., Mojovic' L., Rakin M., Pejin D., Pejin J. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Food Chemistry* v 122, p 216–222, 2010.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Ohgren K., Bura R., Lesnicki G., Sessler J., Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*, v 42, p 834–839, 2007.

Päivi Y., Wim D., Taherzadeh M.J. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzate using a submerged membrane bioreactor at high dilution rates. *Bioresource Technology*, v 164, p 64–69, 2014.

Pandey A, Azmi W, Singh J, Banerjee U.C. Types of fermentation and factors affecting it. In: Joshi VK, Pandey A, editors. *Biotechnology: Food Fermentation*. New Delhi: Educational Publishers, p 383–426, 1999.

Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v 35, p 1153–1169, 2000.

Pathak A.D., Kapur R., Solomon S., Kumar R., Srivastava S., Singh P.R. Sugar Beet: A Historical Perspective in Indian Context. *Sugar Tech*, v 16(2), p 125–132, 2014.

Peng X.W., Chen H.Z. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresource Technology*, v 99, p 3885–3889, 2008.

Plackett R.L., Burman J.P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, v 33, p 305–325, 1946.

Raele R., Boaventura J.M.G, Fischmann A.A., Sarturi G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil *Technological Forecasting & Social Change*, v 87, p 205–223, 2014.

Rodrigues M.I., Iemma A.F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 2ª Edição, Campinas, SP. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

Roussos S., Raimbault R., Prebois J.P., Lonsane B.K. Zymotis, a large scale solid state fermenter *Applied Biochemistry Biotechnology*, v 42, p 37–52; 1993.

Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*. v 37, p 19–27, 2012.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Saha B.C., Nichols N.N., Qureshi N., Cotta M.A. Comparison of separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation processes for ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v 92, p 865–874, 2011.

Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W. *Biotecnologia Industrial*, v 2, São Paulo, 2001.

Sheehan J., Aden A., Paustian K., Killian K., Brenner J., Walsh M. Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *Journal of Industrial Ecology*, v 7, p 117–46, 2003.

Singh A., Bishnoi N.R. Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. *Industrial Crops and Products*, v 41, p 221–226, 2013.

Singh A., Bajar S., Bishnoi N. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. *Fuel*, v 116, p 699-702, 2014.

Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., Pandey A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v 44, p 13-18, 2009.

Singhania R.R., Sukumaran R.K., Patel A.K., Larroche C., Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v 46, p 541–549, 2010.

Sukumaran R.K., Singhania R.R., Mathew G.M., Pandey A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v 34, p 421–424, 2009.

Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v 83, p 1–11, 2002.

Taherzadeh M.J., Karimi K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, v 2, p 472–99, 2007.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Takagi M., Abe S., Suzuki S., Emert G.H., Yata N. A method for production of alcohol directly from cellulose using cellulase and yeast, in: Proceedings of the Bioconversion Symposium, IIT, Delhi, p 551–571, 1977.

Turhan I., Katherine L., Bialka D., Demirci A., Karhan M. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v 101, p 5290–5296, 2010.

União da Indústria de Cana de Açúcar, UNICA, 2015. Em: www.unica.com.br

Vincent M., Pometto III A.L., J., van Leeuwen H. Ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation of sodium hydroxide treated corn stover using *Phanerochaete chrysosporium* and *Gloeophyllum trabeum*. *Bioresource Technology*, v 158, p 1–6, 2014.

Vohra M., Manwar J., Manmode R., Padgilwar S., Patil S. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v 2, p 573–584, 2014.

Wang L., Sharifzadeh M., Templer R., Murphy R.J. Bioethanol production from various waste papers: Economic feasibility and sensitivity analysis. *Applied Energy*, v 111, p 1172–1182, 2013.

Wu M., Wang M., Huo H. Fuel-cycle assessment of selected bioethanol production pathways in the United States. Center for transportation research, energy system division. Argonne national laboratory; 2006.

Wyman C.E., Ayres R.U., Costanza R., Goldemberg J. Ethanol fuel, in: C.J. Cleveland. *Encyclopedia of Energy*, v 2, Elsevier Science, 2004, p 541–555.

Xin F., Zhang H., Wong W. Bioethanol Production from Horticultural Waste Using Crude Fungal Enzyme Mixtures Produced by Solid State Fermentation. *Bioenergy Resources*, v 6, p 1030–1037, 2013.

Yamada R., Yamakawa S., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. *Enzyme and Microbial Technology*, v 48, p 393–396, 2010.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Yu L., Tsao R., Shahidi F. *Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits*, First Edition, John Wiley & Sons, 2012.

Zheng Y., Yu C., Cheng Y.S., Lee C., Simmons C.W., Dooley T.M., Zhang R., Jenkins B.M., VanderGheynst J.S. Integrating sugar beet pulp storage, hydrolysis and fermentation for fuel ethanol production. *Applied Energy*, v 93, p 168–175, 2012.

APENDICE A

Optimization of solid-liquid extraction of ethanol obtained by solid-state fermentation of sugarcane bagasse

N.I. CANABARRO[†], J.F. SOARES[†], W.L. PRIAMO[‡], R.C. KUHN[†], E.L. FOLETTTO[†], S.L. JAHN[†] and M.A. MAZUTTI[†].

[†]Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, Brazil. *mazutti@ufsm.br*

[‡]Department of Food Technology, IFRS - Campus Sertão, Sertão, RS, 88040-900, Brazil.

wagner.priamo@sertao.ifrs.edu.br

Abstract— Solid-state fermentation has arrived as an alternative to reduce the amount of waste water in ethanol fermentation. However, the recovery of ethanol from solid medium should be investigated, since depending of experimental condition used in the extraction, significant difference in the results can be obtained. In this work was investigated the influence of temperature (30-50°C), solid to liquid ratio (0.1-0.4 wt%) and orbital agitation (50-180 rpm) in the recovery of ethanol from sugarcane bagasse at different fermentation conditions of moisture content (50-80%) and ethanol amount (5-20 wt%). The highest recovering efficiency was 81.3% at 30°C, initial ethanol amount of 10 wt%, orbital agitation of 100 rpm and moisture content of 60%. The main contribution of this work was to demonstrate that the amount of water used in the extraction is lesser than that used in traditional liquid fermentation, making possible to obtain a more concentrated broth, saving with water treatment and energy for ethanol concentration.

Keywords— ethanol extraction; solid-state fermentation; water management; reducing energy cost; reducing water consumption.

I. INTRODUCTION

Brazil is known as the greatest sugarcane producer in the worldwide, which is the basis for ethanol production. Brazil produces around 25 billions of liters of ethanol per year, being expected to reach 36 billions of liters in the 2012/13 crop (ISO 2013). In recent years, the efforts in research and development have been directed toward reducing the input energy and cost for production of bioethanol as the most promising biofuel (Moukamnerd et al. 2010).

For practical production, the total energy balance throughout the entire process including the pre- and post-fermentation must be considered, because biomass transportation of biomass and waste water treatment, respectively, require much energy (Luo et al. 2009). Most of the conventional ethanol production methods involve liquid fermentation and exhaustion of

fermentation broth and residue (Brites et al.,2012), which require large amounts of energy and cost for treatment. A conventional method for the fermented exhaustion is the distillation process, which reaches around 97% efficiency in the separation of ethanol from fermented (Mayer et al., 2013). In addition, because the water content of fermentation residues is high, a considerable amount of energy is required to dry them before incinerating or recycling them as fertilizers (Jain et al. 2013).

To reduce the amount of waste water in ethanol fermentation, solid-state fermentation (SSF) is one of the preferable options. In the process of bread dough where the water content is about 50%, it is known that yeast is quite active and produce ethanol and carbon dioxide. The application of solid-state fermentation for ethanol production from biomass, however, requires the regulation of sugar and ethanol contents in the fermentation mixture below suitable levels because the high osmotic pressure and high ethanol content can decrease the fermentative activity of yeast (Moukamnerd et al. 2010). In addition, SSF presents potential advantages such as: smaller volumes of fermentation mash, less requirement of water, physical energy requirement, capital investment and operating costs, reduced reactor, and lower space requirement, among others (Yadegary et al. 2013).

In recent years, some researches were published focusing the ethanol production by solid-state fermentation. Lin et al. (2013) evaluated the production of ethanol from sugarcane bagasse by simultaneous saccharification and fermentation using a pilot rotary drum reactor (capacity of 100L). These authors demonstrated that the performance and the chosen SSF operating conditions for the drum reactor scale-up was as effective as those attained from flask runs and the use of rotary drum reactor for cellulosic ethanol production under SSF operating conditions is simple to scale up and shows commercial potential. Chu et al. (2012) employed solid-state fermentation of enzymatic hydrolysis residue and available to enhance ethanol production and cellulose-to-ethanol conversion. Kwon et al. (2011) and Yu et al. (2008) studied the ethanol production using sweet sorghum by solid-state fermentation. Moukamnerd et al. (2010) developed a consolidated continuous solid-state fermentation system for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of raw corn starch. Wang et al. (2010) developed and validated a model of a rotating drum bioreactor with capacity of 5 m³ for ethanol production by solid-state fermentation. Sree et al. (1999) used solid substrate fermentation to produce ethanol from various starchy substrates like sweet sorghum, sweet potato, wheat flour, rice starch, soluble starch and potato starch by simultaneous saccharification and fermentation process.

Although the studies reported above demonstrated that solid-state fermentation can be effective for ethanol production, this kind of fermentation present an inherent difficulty that is the separation of product from solid fermented material. Studies carried out for enzyme recovery demonstrated that depending of experimental condition used in the extraction, significant difference in the results can be obtained (Bender et al., 2008). Several studies are performed to optimize the extraction process of products of commercial interest (Gharekhani et al., 2012; Palmeira et al., 2012; Brites et al.,2012).Taking into account that the studies reporting the ethanol production did not focus in the extraction process, then the main objective of this work was to investigate the influence of temperature (30-50°C), solid to liquid ratio (0.1-0.4 wt%) and orbital agitation (50-180 rpm) in the recovery of ethanol from sugarcane bagasse at different fermentation conditions of moisture content (50-80%) and ethanol amount (5-20 wt%).

II. MATERIAL AND METHODS

A. Raw material and chemicals

In this work was used sugarcane bagasse obtained in a local distillery, dried at 60°C for 72 hours, ground and sieved, collecting the particles that passed through a sieve of 16 mesh. The samples were then stored at room temperature under nitrogen atmosphere prior to the extraction. The ethanol was purchased from Vetec – Brazil with 99.8% purity.

B. Experimental procedure for ethanol extraction

As the objective of the work was to evaluate the influence of different parameters in the extraction of ethanol from sugarcane bagasse after the fermentation, it is important to study the procedure from a raw material that present known amount of ethanol and moisture content. For this reason, it was decided do not carry out the fermentations because is not possible determine the real amount of ethanol produced in the medium due to loss by evaporation and adsorption in the solid material, leading to errors in the determination of recovery efficiency. To overcome this difficulty, it was simulated a fermentation with different moisture content (ranging from 50 to 80%) and ethanol amount (5-20 wt%), obtaining a solid-material with known moisture and ethanol content, making possible the correct determination of recovery efficiency.

For this purpose, 50 g of dry bagasse were used in each experiment, being corrected the moisture at specified level using deionized water and sterilized at 121°C for 20 min (to simule real fermentation condition). Afterwards, a determined amount of ethanol was added to the autoclaved solid medium and manually homogenized for 10 minutes. The resulting solid material was sealed and maintained under rest for 60 minutes to guarantee a satisfactory adsorption of ethanol into solid bagasse.

After the “simulated fermentation” described above, the solid material was used for ethanol extraction, where a determined amount of deionized water was added aiming to reach the specified solid to liquid ratio, following incubation at determined temperature and orbital agitation. The amount of ethanol recovered was assayed in the supernatant after centrifugation at 4°C, 15.000 rpm for 15 min. The recovery of ethanol was evaluated at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 30 and 60 minutes of extraction. The end result was the arithmetic average of all results obtained through of different fermentation conditions.

The different fermentation conditions such as moisture content (50-80%) and ethanol amount in the fermented bagasse (5-20 wt%), as well as different extraction conditions such as temperature (30-50°C), orbital agitation (50-180 rpm) and solid to liquid ratio (0.1-0.4 wt%). The influence of variables was analyzed considering the methodology of one-factor-one-time.

C. Determination of ethanol

After the extractions, an aliquot (5 mL) of supernatant was used for direct determination of ethanol content using the AlcoLyzer Wine M/WE – Wine Analysis System (Antoon Par). The results obtained, expressed in terms of ethanol % v/v, was converted to ethanol wt% and the percent recovery of ethanol determined, taking into account the initial amount added.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Influence of fermentation parameters on recovery of ethanol

Table 1 presents the results concerning ethanol recovering for different moisture contents of fermented sugarcane bagasse. The results are demonstrating that for high moisture content of solids the recovery is more efficient, since 74.3% of ethanol added to bagasse was recovered when the moisture content was 80%, whereas only 57.6% was recovered at moisture content of 50%. This result is interesting from an industrial viewpoint, since fermentations with high moisture content are preferable for yeast growth, due to the high water activity of solids. In practice, the results obtained here are showing that will be possible to obtain high recovering of ethanol at experimental conditions that present good characteristics for microbial growth. For fixed-bed bioreactors, it is difficult to maintain the moisture content at an high level, due to loss by evaporation. However, the use of rotating drum bioreactors can be an effective alternative, due to possibility to replace the water evaporated in the process.

Table 1| Influence of moisture content on recovering of ethanol from bagasse.

Run	Moisture content (%)	Ethanol recovered (%)
1	50	57.6
2	60	61.8
2	70	67.5
4	80	74.3

Fixed variables: 30°C, solid to liquid ratio of 0.1 wt%, orbital agitation of 100 rpm and initial ethanol amount of 10 wt%.

Other variable important during the recovering the ethanol from fermented sugarcane bagasse is it the amount produced by the microorganism, which can vary greatly in the fermentation, depending of the experimental condition used. In this sense, Table 2 presents the results concerning ethanol recovering at different ethanol amount in the medium. The efficiency of recovering decreased conform the ethanol amount was increasing in the medium. For sake of comparison, the amount recovered when the amount of ethanol added was 5 wt% was around 20% higher than adding 20 wt% was added. The results presented here are indicating that the recovering will be decrease for high production of ethanol in the medium.

Table 2| Influence of initial amount of ethanol on recovering from bagasse.

Run	Ethanol amount (%)	Ethanol recovered (%)
1	5	67.3
2	10	61.4
3	15	60.9

Fixed variables: 30°C, solid to liquid ratio of 0.1 wt%, orbital agitation of 100 rpm and moisture content of 60%.

B. Influence of extraction parameters on recovery of ethanol

Table 3 presents the results that expressing the effect of solid to liquid ratio on ethanol recovering from fermented sugarcane bagasse. Increasing the solid to liquid ratio was verified a significant increase in the amount of ethanol recovered, reaching 81.3% of recovering for solid to liquid ratio of 0.4 wt%. These results are also attractive on an industrial viewpoint since less water is used during the extraction of ethanol, resulting in more concentrated broth, reducing energy cost in the distillation and in the water treatment. The results presented in Table 3 are showing an advantage of SSF that is the possibility to adjust the amount of water to obtain a concentrated broth (Martins et al. 2011). This point should be taking into account in the analysis of economical feasibility of an industrial plant for ethanol production by solid-state fermentation.

Table 3| Influence of solid to liquid ratio on ethanol recovering from bagasse.

Run	Solid to liquid ratio (wt%)	Ethanol recovered (%)
1	0.1	23.8
2	0.2	45.5
3	0.3	61.4
4	0.4	81.3

Fixed variables: 30°C, initial ethanol amount of 10 wt%, orbital agitation of 100 rpm and moisture content of 60%.

Table 4 presents the results concerning the influence of temperature in the extraction of ethanol from sugarcane bagasse. In a general way, the temperature did not present significant alterations in the amount of ethanol recovered. The lower temperature evaluated (30°C) presented the higher ethanol recovering, about 61.4%. This result was possible because ethanol is very soluble in water, in a manner that low amount of water is sufficient to solubilize most of ethanol present. Obviously, the solid matrix is complex and part of ethanol stay adsorbed in internal structure, leading to decrease the recovery efficiency. In practice, the result obtained is desirable, because the extraction can be accomplished industrially at room temperature, without the necessity to use energy to adjust the temperature in the extraction.

Table 4| Influence of temperature on ethanol recovering from bagasse.

Run	Temperature (°C)	Ethanol recovered (%)
1	30	61.4

Apêndice A

2	40	58.8
3	50	59.6

Fixed variables: initial ethanol amount of 10 wt%, orbital agitation of 100 rpm, solid to liquid ratio of 0.1 wt% and moisture content of 60%.

Table 5 presents the results that expressing the effect of orbital agitation on ethanol recovering from fermented sugarcane bagasse. The results demonstrated that no significant alteration in the recovery efficiency was obtained for orbital agitation ranging from 50 to 150 rpm. However, for orbital agitation of 180 rpm, was verified a decreasing in the efficiency around 15%, probably due to evaporation of ethanol during the extraction. It is important to emphasize that mild orbital agitation is enough to recovery about 60% of all ethanol added.

Table 5| Influence of orbital agitation on ethanol recovering from bagasse.

Run	Orbital agitation (rpm)	Ethanol recovered (%)
1	50	61.1
2	100	61.4
3	150	63.8
4	180	54.4

Fixed variables: 30°C, initial ethanol amount of 10 wt%, orbital agitation of 100 rpm, solid to liquid ratio of 0.1 wt% and moisture content of 60%.

The better condition for ethanol recovering were the ethanol amount of 10 wt%, solid to liquid ratio 0,4 wt%, orbital agitation of 100 rpm, moisture content of 60% and temperature of 30°C, in this condition the ethanol recovering was 81.3%. These results can be improved if the orbital agitation and moisture content were increased, as can be observed in the influence of moisture content (Table 1) and the influence of orbital agitation (Table 5).

IV. CONCLUSIONS

In this work was demonstrated that the extraction process is an important step during the production of ethanol by solid-state fermentation. At the optimized condition at 30°C, the initial ethanol amount of 10 wt%, solid to liquid ratio 0,4 wt%, orbital agitation of 100 rpm and moisture content of 60% promoted an ethanol recovery of 81.3%. Even at optimized condition, the recovery of ethanol was not total, demonstrating that is important to define the extraction conditions before the fermentation. Other important results presented here are related to the influence of solid to liquid ratio on the recovering efficiency, where was demonstrated that the amount of water used in the extraction is lesser than that used in traditional liquid fermentation, making possible to obtain a more concentrated broth, saving with water treatment and energy for ethanol concentration (responde a correção sobre a razão sólido/líquido que foi questionada pelo revisor)

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge CNPQ and CAPES for the financial support and scholarships.

REFERENCES

- Bender, J.P., Mazutti, M.A., Di Luccio, M. and Treichel, H. Extraction of Inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149, 195–203. (2008)
- Brites, L.M., Oliveira, J.H., Barboza, M. and Hokka, C.O. Effect of physicochemical properties of solvents on Clavulanic acid extraction from fermentation broth. *Latin American Applied Research*, 42:65-70. (2012)
- Chu, Q., Li, X., Ma, B., Xu, Y., Ouyang, J., Zhu, J., Yu, S. and Yong, Q. Bioethanol production: An integrated process of low substrate loading hydrolysis-high sugars liquid fermentation and solid state fermentation of enzymatic hydrolysis residue. *Bioresour. Technol.* 123, 699–702. (2012)
- Gharekhani, M., Ghorbani, M. and Rasoulnejad, S. Microwave-assisted extraction of phenolic and flavonoid compounds from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn leaves as compared with ultrasound-assisted extraction. *Latin American Applied Research*, 42:305-310. (2012)
International Sugar Organization (ISO). Available in <http://www.isosugar.org>.
- Jain, A., Morlok, C.K. and Henson, J.M. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97,905–917. (2013)
- Kwon, Y.J., Wang, F. and Liu, C.Z. Deep-bed solid state fermentation of sweet sorghum stalk to ethanol by thermotolerant *Issatchenkia orientalis* IPE 100. *Bioresour. Technol.* 102, 11262–11265. (2011)
- Lin, Y.S., Lee, W.C., Duan, K.J. and Lin, Y.H. Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Energ.* 105, 389–394. (2013)
- Luo, L., Voet, E. and Huppes, G. An energy analysis of ethanol from cellulosic feedstock-corn stover. *Renew. Sus. Energ. Rev.* 13, 2003–2011. (2009)
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N. and Teixeira, J.A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol. Adv.* 29(3), 365-73. (2011)
- Mayer, F.D., Hoffmann, R.S. and Hoffmann, R. An innovative project involving an appropriate hybrid distillation system for small-scale ethanol fuel production. *Chemical Engineering Communications*, 200:4, 563-574. (2013)
- Moukamnerd, C., Kino-oka, M., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., Harashima, S., Ninomiya, K., Shioya, S. and Katakura, Y.. Ethanol production from biomass by repetitive solid-state fed-batch fermentation with continuous recovery of ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 87–94. (2010)

Apêndice A

- Palmeira, S. M. V., Gois, L. M. and Souza, L. D. Extraction of phenolic compounds from mango peels. *Latin American Applied Research*, 42:77-81. (2012)
- Sree, N.K., Sridhar, M., Suresh, K. and Rao, L.V. High alcohol production by solid substrate fermentation from starchy substrates using thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng.* 20, 561-563. (1999)
- Wang, E.Q., Li, S.Z., Tao, L., Geng, X. and Li, T.C. Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation. *Appl. Energ.* 87, 2839–2845. (2010)
- Yadegary M, Hamidi A, Alavi SA, Khodaverdi E, Yahaghi H, Sattari S, Bagherpour G, Yahaghi E. Citric Acid Production From Sugarcane Bagasse through Solid State Fermentation Method Using *Aspergillus niger* Mold and Optimization of Citric Acid Production by Taguchi Method. *Jundishapur J Microbiol.* November; 6(9):e7625 (2013).
- Yu, J., XuZhang and Tan, T. Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel Process. Technol.* 89, 1056-1059. (2008)