



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E**  
**BIOLÓGICA – PPGTQB**

**ESTUDOS SOBRE O USO DO ARROZ *BRS AG* PARA A**  
**PRODUÇÃO DE ETANOL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ISABELA CASTRO DE ALMEIDA**

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.**  
**Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

**Brasília, Junho de 2017**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS  
QUÍMICA E BIOLÓGICA – PPGTQB**

**ESTUDOS SOBRE O USO DO ARROZ *BRS AG* PARA A  
PRODUÇÃO DE ETANOL**

*Dissertação apresentada ao Instituto  
de Química da Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre.*

**ISABELA CASTRO DE ALMEIDA**

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.**

**Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

**Brasília, Junho de 2017**

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Isabela Castro de Almeida**, matrícula nº **15/0102542**, intitulada “***Estudos sobre o uso do arroz BRS AG para a produção de etanol***”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 6 de junho de 2017.

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva  
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sarah Silva Brum  
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira  
Membro Titular (Embrapa Agroenergia)

Dr. Rossano Gambetta  
Membro Suplente (Embrapa Agroenergia)

Em 6 de junho de 2017.

## DEDICATÓRIA

*À minha família, por sempre estar ao meu lado.  
Aos meus orientadores, por todo apoio e confiança transmitidos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre guiar meus passos, me dar força e me mostrar que por mais difícil que a situação pareça eu não devo desistir.

A minha mãe Márcia, e a minha irmã Natália, por sempre estarem ao meu lado, nos momentos alegres e nas dificuldades. Vocês são minha base, meu porto seguro, motivo de maior orgulho, e sem vocês nenhum dos meus sonhos se tornariam realidade. Mãe, obrigada por me erguer sempre que preciso, por me fazer enxergar que sou capaz de atingir todos os sonhos e objetivos, basta dedicação. Irmã, obrigada por fazer importante os momentos mais simples, e por sempre me fazer sorrir. Seu jeito único de ser me cativa todos os dias.

Ao meu pai, Manoel, por me mostrar todos os dias que as dificuldades estão aí para serem vencidas, e que cada tropeço serve para me fortalecer ainda mais.

Agradeço a todos da minha família, que vivenciaram cada conquista que tive durante minha vida. Vocês sempre me deram força para continuar.

A todos os meus amigos e amigas, especialmente a Rayssa. Minha melhor amiga, cúmplice e confidente. Obrigada por tudo que você faz por mim, agradeço por cada conselho e cada puxão de orelha.

A Universidade de Brasília, e a Unidade Embrapa Agroenergia, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Aos orientadores Fabricio Machado e Sílvia Belém, por todo conhecimento transmitido e pela confiança em meu trabalho. Agradeço pela dedicação, pelas inúmeras correções e por toda paciência que tiveram comigo.

Agradeço a todos do Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB) da Embrapa Agroenergia, que tornaram possível esse estudo e me ajudaram de alguma forma, em especial aos queridos amigos Andréia, Débora, Mayara, Mayume, Pedro e Renan.

Agradeço de todo o coração a Jamille. Não teria conseguido sem seu apoio e ajuda. Obrigada pelas conversas, broncas, gargalhadas, almoços *fitness*, idas ao shopping.

## RESUMO

O presente trabalho avaliou o potencial de utilização do arroz BRS AG, desenvolvido pela Embrapa Clima Temperado, como biomassa para a produção de etanol. Comparativamente, também foram realizados estudos sobre a conversão do arroz comercial (BRS PAMPA) em etanol. Inicialmente o amido presente no arroz é hidrolisado à açúcares monoméricos fermentáveis, glicose, para posterior processo de fermentação. Isso porque a principal levedura utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, não consegue converter diretamente o amido em etanol. O processo de conversão do amido presente no arroz comercial (BRS PAMPA) em glicose foi otimizado, variando-se o tempo de ação das enzimas, para posterior utilização das melhores condições reacionais na hidrólise do arroz BRS AG. Na reação de hidrólise que levou a maior concentração final de glicose (130,16 g/L), a etapa de liquefação com a enzima Termamyl 2X ocorreu por 1 h, seguida da sacarificação com a enzima AMG 300 L por 3 h. Adotando-se as mesmas condições reacionais, obteve-se 133,28 g/L de glicose para a hidrólise com o arroz BRS AG. Avaliou-se o comportamento de diferentes linhagens comerciais da levedura *S. cerevisiae*: BG-1; CAT-1; FT-858; JP-1; PE-2; SA-1, em reações de fermentação dos hidrolisados de arroz, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 32 °C, conduzidas em Shaker Orbital. Os maiores rendimentos das fermentações com o hidrolisado de arroz comercial foram obtidos pelas leveduras SA-1, rendimento de 93% e concentração final de etanol de 58,92 g/L, e CAT-1, rendimento de 92,7% e concentração final de etanol de 58,93 g/L. Para as fermentações com o hidrolisado de arroz gigante, os maiores rendimentos foram obtidos pelas leveduras FT-858, rendimento de 94,8% e concentração final de etanol de 66,13 g/L, e CAT-1, rendimento de 94,4% e concentração final de etanol de 65,85 g/L. Após análise dos resultados obtidos para as fermentações com as diferentes linhagens da *S. cerevisiae*, a levedura CAT-1 foi utilizada nas fermentações realizadas em reator. O rendimento para a fermentação com arroz comercial foi de 57,9% e para o arroz gigante 59,2%. Os valores obtidos foram baixos em comparação as fermentações realizadas com essa levedura para os hidrolisados de arroz em erlenmeyer no sistema de agitação em Shaker Orbital. O volume ocupado no reator com os respectivos hidrolisados de arroz correspondia a 30% do volume total. Em contrapartida, ocupou-se 56% do volume total do erlenmeyer com os hidrolisados para as fermentações realizadas em Shaker Orbital. Com isso, a maior quantidade de oxigênio presente nas fermentações em reator favoreceu o crescimento celular, à fermentação anaeróbica, obtendo-se menor rendimento de etanol. Além disso, os valores obtidos para o rendimento de etanol

após fermentação dos hidrolisado foram baixos em comparação a plantas eficientes de produção etanol de milho. Dessa forma, esse trabalho possui como perspectivas futuras a otimização dos parâmetros fermentativos, visando a melhoria do processo, a obtenção de maiores rendimentos de etanol, e menor formação de coprodutos. Como um estudo preliminar, o processo de obtenção de etanol a partir de arroz (BRS AG e comercial) foi simulado com o auxílio do software Aspen Plus®, permitindo estabelecer condições operacionais para determinação dos balanços de massa das correntes de processo. Resultados das simulações mostraram que existe um grande potencial de simuladores de processos químicos aliados as informações provenientes de fermentações realizadas em escala de laboratório.

## ABSTRACT

The present study evaluated the potential of BRS AG, also called giant rice, as biomass for ethanol production. Comparatively, studies on the conversion of commercial rice (BRS PAMPA) into ethanol were also carried out. Initially the starch present in the rice is hydrolyzed into fermentable monomeric sugars, glucose, for later fermentation process. This is because the main yeast used, *Saccharomyces cerevisiae* don't convert the starch to ethanol directly. The starch conversion present in commercial rice (BRS PAMPA) to glucose was optimized varying the time of enzymes action. The best reaction conditions were used in the hydrolysis of BRS AG rice. The hydrolysis reaction that led to the highest final glucose concentration (130.16 g/L) was performed with 1 h of liquefaction using Termamyl 2X, followed by saccharification with AMG 300 L for 3 h. The same reaction conditions were adopted with BRS AG rice hydrolysis and the glucose concentration obtained was 133.28 g/L. Different commercial strains of *S. cerevisiae* yeast, BG-1; CAT-1; FT-858; JP-1; PE-2; SA-1, were evaluated in fermentation reactions of rice hydrolyzates, performed in Shaker Orbital. The highest yields fermentation with commercial rice hydrolyzate were obtained by SA-1 yeasts, 93% yield and ethanol concentration of 58.92 g/L, and CAT-1, 92.7% yield and ethanol concentration of 58.93 g/L. For fermentations with giant rice hydrolyzate, highest yields were obtained by FT-858 yeast, 94.8% yield and ethanol concentration of 66.13 g/L, and CAT-1, yield 94.4 % and ethanol concentration of 65.85 g/L. After analyzed the fermentations results with different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, the yeast CAT-1 was used in the fermentations carried out in the reactor. The yield obtained for fermentation of commercial rice was 57.9% and for the giant rice 59.2%. These values were low compared to the fermentations carried out in erlenmeyers with this yeast for rice hydrolyzates in the Shaker Orbital stirring system. The volume occupied in the reactor with the respective rice hydrolyzates corresponded to 30% of the total volume. In contrast, 56% of the erlenmeyer total volume was filled with the hydrolyzates for the fermentations carried out in Shaker Orbital. In this way, higher amount of oxygen present in the reactor fermentations favored the cell growth, to the anaerobic fermentation, obtaining a lower ethanol yield. In addition, the values obtained for ethanol yield after fermentation of rices hydrolyzate were low compared to yield of efficient corn ethanol production plants. Thus, this work has as future prospects the optimization of

fermentation parameters, aiming to improve the process, obtaining higher ethanol yields, and lower co-product formation. As a preliminary study, the process of ethanol production from rice (BRS AG and commercial) was simulated with aid of Aspen Plus® software, allowing to establish operational conditions for determination of the mass balance of the process streams. Simulations results showed that there is a great potential of chemical processes simulators allied to the information obtained from fermentations carried out in laboratory scale.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. ETANOL COMBUSTÍVEL .....</b>	<b>4</b>
3.1.1. Produção de Etanol no Brasil .....	6
3.1.2 Etanol de 2ª Geração .....	7
<b>3.2. ETANOL DE AMIDO .....</b>	<b>8</b>
3.2.1. Arroz como Matéria-prima .....	9
<b>3.3. AMIDO .....</b>	<b>11</b>
3.3.1 Amilose .....	13
3.3.2 Amilopectina .....	13
<b>3.4. HIDRÓLISE DE BIOMASSAS AMILÁCEAS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.5. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. REAGENTES .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.2.1. MOAGEM DAS MATÉRIAS-PRIMAS .....	21
4.2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	21
4.2.2.1. Otimização do Processo de Hidrólise Enzimática .....	21
4.2.2.2. Hidrólise Enzimática das Amostras de Arroz Comercial e Arroz BRS AG .....	22
4.2.3. PREPARO DO MEIO DE CULTURA RICO YPG 10% .....	24
4.2.3.1. Meio de Cultura Líquido YPG 10% .....	24
4.2.3.2. Meio de Cultura Sólido YPG 10% .....	25
4.2.4. PREPARO DAS LEVEDURAS .....	25
4.2.4.1. Hidratação da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 Liofilizada .....	26

4.2.4.2. Preparo do Inóculo das Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no Meio de Cultura Rico .....	26
4.2.5. DETERMINAÇÃO PESO SECO DAS LEVEDURAS .....	28
4.2.6. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	29
4.2.6.1 Preparo de Soluções de Trabalho .....	30
4.2.6.2 Contagem de Células Viáveis de Leveduras.....	31
4.2.7. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE ARROZ COMERCIAL E DE ARROZ GIGANTE .....	32
4.2.7.1. Fermentação em Erlenmeyer e Shaker Orbital .....	32
4.2.7.2. Reações de Fermentação Conduzidas no Sistema de Fermentação .	34
4.2.8. CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO.....	35
4.2.8.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto Etanol.....	35
4.2.8.2. Rendimento da Fermentação .....	36
4.2.8.3. Produtividade.....	36
4.2.8.4. Velocidade de consumo de substrato.....	36
4.2.9. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....</b>	<b>38</b>
5.1.1. Hidrólise Enzimática do Arroz Comercial e Arroz Gigante nas Condições Determinadas .....	42
<b>5.2. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE ARROZ COMERCIAL E ARROZ GIGANTE .....</b>	<b>44</b>
5.2.1. Fermentação do Hidrolisado de Arroz Comercial com as Diferentes Linhagens de Leveduras da Espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
5.2.2. Fermentação do Hidrolisado de Arroz Gigante com as Diferentes Linhagens de Leveduras da Espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	50
5.2.3. Fermentações Conduzidas no Sistema de Fermentação Dasgip Bioblock .....	57
5.2.3.1 Fermentações conduzidas no Sistema de Fermentação com hidrolisado de Arroz Comercial .....	57

5.2.3.2 Fermentações conduzidas no Sistema de Fermentação com hidrolisado de Arroz Gigante.....	60
5.2.3.3 Comparação das Fermentações Conduzidas no Sistema de Fermentação com Hidrolisado de Arroz Comercial Centrifugado e não Centrifugado .....	62
5.2.3.4 Comparação das Fermentações com Hidrolisado de Arroz Gigante Centrifugado e não Centrifugado, conduzidas no Sistema de Fermentação... ..	65
<b>6. SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE ARROZ COM ASPEN PLUS: AVALIAÇÃO PRELIMINAR .....</b>	<b>68</b>
<b>6.1 SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO ARROZ GIGANTE .....</b>	<b>70</b>
<b>6.2 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO ARROZ COMERCIAL.....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>7.1 CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>7.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>82</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Produção mundial de Etanol de 2007 a 2015. Adaptada. <sup>15</sup> .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Comparação dos grãos da cultivar de arroz convencional BRS Pampa (esquerda) com os grãos da cultivar BRS AG “Gigante” (direita). <sup>9</sup> .....	<b>11</b>
<b>Figura 3.</b> Representação estrutural da amilose e da ligação $\alpha$ -(1-4)-glicosídica. Adaptada. <sup>39</sup> .....	<b>13</b>
<b>Figura 4.</b> Representação estrutural da amilopectina com ligação $\alpha$ -(1-4) e ligação $\alpha$ -(1-6)-glicosídica. Adaptada. <sup>39</sup> .....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> A) Estrutura e classificação das cadeias da amilopectina em A, B e C. B) Amilopectina estruturalmente, formando regiões amorfas e cristalinas nos grânulos de amido. Adaptada. <sup>34</sup> .....	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> Representação do processo de fermentação alcoólica da glicose, levando a formação de duas moléculas de etanol e liberando dióxido de carbono. Adaptada. <sup>52</sup> .....	<b>19</b>
<b>Figura 7.</b> Arroz comercial (A) e arroz gigante (B) antes de passarem pelo moinho de facas tipo Willey Fortinox (C) e após moagem, (D, E), respectivamente. ....	<b>21</b>
<b>Figura 8.</b> Sistema reacional utilizado para as hidrólises enzimáticas do amido presente no arroz comercial e no arroz gigante BRS AG. Onde: (A) béquer com a mistura reacional (arroz previamente moído e tampão citrato de sódio), (B) placa de aquecimento, (C) homogeneizador. ....	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b> Placa de Petri após crescimento celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1. ....	<b>27</b>
<b>Figura 10.</b> Gráficos de correlação de Peso seco de cada linhagem com a densidade ótica, onde: (A) levedura BG-1; (B) levedura CAT-1; (C) levedura FT-858; (D) levedura JP-1; (E) levedura PE-2; (F) levedura SA-1.....	<b>29</b>
<b>Figura 11.</b> Sistema utilizado para as reações de fermentação com as diferentes linhagens da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>33</b>
<b>Figura 12.</b> Sistema de Fermentação Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock, utilizado para as fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante. ....	<b>35</b>

<b>Figura 13.</b> Concentrações de glicose durante as reações de hidrólise enzimática do amido presente no arroz comercial. ....	<b>39</b>
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas referentes as amostras das reações de hidrólise, com: A) 30 min de ação da Termamyl 2x; B) 1h de ação da Termamyl 2X; C) 2 h de ação da Termamyl 2X e D) 3 h de ação da Termamyl 2X. ....	<b>41</b>
<b>Figura 15.</b> Perfis de concentração de glicose durante a etapa de sacarificação, para as hidrólises com arroz comercial e arroz gigante. ....	<b>42</b>
<b>Figura 16.</b> Perfis de concentração de glicose durante as fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz comercial. ....	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b> Perfis de concentração da produção de etanol durante as fermentações com as 6 leveduras, no hidrolisado de arroz comercial.....	<b>46</b>
<b>Figura 18.</b> Perfis de concentração de glicerol durante a fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz comercial. ....	<b>47</b>
<b>Figura 19.</b> Perfis de concentração de glicose durante as fermentações com as 6 leveduras, com o hidrolisado de arroz gigante. ....	<b>51</b>
<b>Figura 20.</b> Perfis de concentração de etanol durante as fermentações com as 6 leveduras, com o hidrolisado de arroz gigante. ....	<b>53</b>
<b>Figura 21.</b> Perfis de concentração de glicerol durante a fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz gigante. ....	<b>54</b>
<b>Figura 22.</b> Curvas referentes ao consumo de glicose, produção de etanol e produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial. ....	<b>58</b>
<b>Figura 23.</b> Curvas referentes ao consumo de glicose, produção de etanol e produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz gigante. ....	<b>60</b>
<b>Figura 24.</b> Curvas referentes ao consumo de glicose e produção de etanol, durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado e não centrifugado. ....	<b>62</b>
<b>Figura 25.</b> Curvas referentes a produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado e não centrifugado. ....	<b>63</b>

<b>Figura 26.</b> Curvas referentes ao consumo de glicose e produção de etanol, para as fermentações realizadas com os hidrolisados de arroz gigante centrifugado e não centrifugado.....	<b>65</b>
<b>Figura 27.</b> Curvas referentes a produção de glicerol para as fermentações realizadas com os hidrolisados de arroz gigante centrifugado e não centrifugado..	<b>66</b>
<b>Figura 28.</b> Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz comercial e arroz gigante como matéria-prima. ....	<b>69</b>
<b>Figura 29.</b> Esquema simplificado do processo contínuo de produção de etanol utilizando arroz comercial e arroz gigante como matéria-prima.....	<b>70</b>
<b>Figura 30.</b> Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz gigante como matéria-prima, com os respectivos fluxos e frações mássicas das correntes de entrada e saída.....	<b>72</b>
<b>Figura 31.</b> Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz comercial como matéria-prima, com os respectivos fluxos e frações mássicas das correntes de entrada e saída.....	<b>76</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produção mundial de etanol em 2016, segundo a <i>Renewable Fuel Association</i> (RFA). Adaptada. <sup>15</sup> .....	<b>5</b>
<b>Tabela 2.</b> Composição aproximada do arroz branco polido. <sup>28</sup> .....	<b>10</b>
<b>Tabela 3.</b> Teor de amilose e amilopectina presentes em alguns amidos naturais. Adaptada. <sup>36</sup> .....	<b>12</b>
<b>Tabela 4.</b> Fermentações realizadas em erlenmeyer com as diferentes leveduras e hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante. ....	<b>32</b>
<b>Tabela 5.</b> Reações enzimática realizadas para otimização do tempo no processo de hidrólise do amido presente no arroz. ....	<b>38</b>
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros das Fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz comercial com as diferentes linhagens da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , após 48 h de fermentação. ....	<b>48</b>
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros das Fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz gigante com as diferentes linhagens da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	<b>55</b>
<b>Tabela 8.</b> Componentes químicos presentes no processo do modelo proposto com a utilização do Aspen Plus®. ....	<b>68</b>
<b>Tabela 9.</b> Fluxo de massa nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante. ....	<b>70</b>
<b>Tabela 10.</b> Frações mássicas nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante. ....	<b>71</b>
<b>Tabela 11.</b> Fração mássica em algumas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante. ....	<b>74</b>
<b>Tabela 12.</b> Fluxo mássico nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial. ....	<b>75</b>
<b>Tabela 13.</b> Frações mássicas nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial. ....	<b>75</b>
<b>Tabela 14.</b> Fração mássica em algumas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial. ....	<b>77</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIações

ABS	Absorbância
AGUA	Corrente de saída de água
AGUAREP	Corrente de entrada de água de reposição
BG-1	Linhagem da Usina Barra Grande
BOMBA01	Bomba 01
BOTCOL01	Corrente do fundo da coluna de absorção 1
BOTCOL02	Corrente do fundo da coluna de absorção 2
BOTSEP01	Corrente de saída de fundo do separador 1
BOTSEP02	Corrente de saída de fundo do separador 2
CAT-1	Linhagem da Usina Catanduva (Ribeirão Preto)
CENT	Sistema de centrifugação
CIMA	Conselho Internacional do Açúcar e do Alcool
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO2	Corrente de saída de CO <sub>2</sub>
COL01	Coluna de absorção 1
COL02	Coluna de absorção 2
COL03	Coluna de absorção 3
COMP01	Compressor 1
DO	Densidade ótica
ETANOL	Corrente de saída de etanol
ENTSEP03	Corrente de entrada do separador 3
ENTT01	Corrente de entrada no trocador de calor 1

ENTT03	Corrente de entrada do trocador de calor 3
FT-858	Linhagem Selecionada pela Fermentec
H <sub>2</sub> O-MUP	Corrente de entrada de água na coluna 3
JP-1	Linhagem da Destilaria Japungu (Paraíba)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIST01	Tanque de mistura 1
MIX01	Misturador 1
MIX02	Misturador 2
PE-2	Linhagem da Usina Pedra (Ribeirão Preto)
R (%)	Rendimento em porcentagem
R01	Reator 1
R02	Reator 2
RESIDUO	Corrente de saída do sistema de centrifugação
RFA	Renewable Fuels Association
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SA-1	Linhagem da Usina Santa Adélia (Pereira Barreto, SP)
SAICOMP1	Corrente de saída do compressor 1
SAIMIST	Corrente de saída do misturador 1
SAIMIX01	Corrente de saída do misturador 1
SAIMIX02	Corrente de saída do misturador 2
SAIR01	Corrente de saída do reator 1
SAIR02	Corrente de saída do reator 02
SAIT01	Corrente de saída do trocador de calor 1
SAIT02	Corrente de saída do trocador de calor 2
SAIT03	Corrente de saída do trocador de calor 3

SAIT04	Corrente de saída do trocador de calor 4
SAIT05	Corrente de saída do trocador de calor 5
SAIT06	Corrente de saída do trocador de calor 6
SEP01	Separador 1 ( <i>Vaso Flash</i> )
SEP02	Separador 2 ( <i>Vaso Flash</i> )
SEP03	Separador 03 ( <i>Vaso Flash</i> )
T01	Trocador de calor 1
T02	Trocador de calor 2
T03	Trocador de calor 3
T04	Trocador de calor 4
T05	Trocador de calor 5
T06	Trocador de calor 6
TOPCOL01	Corrente do topo da coluna de absorção 1
TOPCOL02	Corrente do topo da coluna de absorção 2
TOPSEP01	Corrente de saída do topo do separador 1
TOPSEP02	Corrente de saída do topo do separador 2
TOPSEP03	Corrente do topo do separador 3
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto
YPG	Extrato de levedura, Peptona bacteriológica, glicose

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo do século XX, o petróleo, o carvão e o gás natural tornaram-se a principal fonte de energia mundial e a principal base para a indústria química. Porém, tratam-se de recursos não renováveis, com forte impacto ambiental, responsáveis pela emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), um dos principais gases do efeito estufa.<sup>1</sup> Além dos problemas ambientais e energéticos, com as mudanças climáticas globais já perceptíveis, a instabilidade política nos países exportadores de petróleo, bem como a escassez e a alta dos preços dos combustíveis fósseis fez com que o interesse internacional por combustíveis alternativos que possam substituir ou complementar o uso de combustíveis de origem fóssil aumentasse a cada ano.<sup>2</sup> Uma alternativa viável e bastante promissora à utilização dos recursos fósseis é o emprego do etanol como fonte de energia.<sup>3</sup> Esse combustível já vem sendo utilizado como substituto da gasolina em motores de combustão há alguns anos.<sup>4</sup>

Atualmente, os Estados Unidos e o Brasil, são os maiores produtores de etanol combustível. Os Estados Unidos utilizam o amido do milho como fonte de carboidratos no processo fermentativo. Já o Brasil, utiliza a sacarose presente na cana-de-açúcar para obtenção de etanol.<sup>5</sup>

A produção industrial de etanol é feita por um processo fermentativo onde ocorre a conversão de açúcares em álcool, com a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>6</sup> Uma grande variedade de biomassas podem ser utilizadas no processo fermentativo, como por exemplo, milho, cana-de-açúcar e beterraba.<sup>4</sup>

Um elevado rendimento na produção de etanol é obtido ao se utilizar uma matéria-prima rica em amido.<sup>7</sup> Biomassas vegetais amilácea, como milho, cevada, trigo, batata, batata-doce, mandioca e arroz mostram-se promissoras para a produção de etanol devido a sua viabilidade econômica e disponibilidade. Porém, a utilização dessas matérias-primas para fins energéticos pode afetar os preços dos produtos alimentícios.<sup>8</sup> Visando evitar a concorrência de preços entre a indústria alimentícia e a produção de combustível, muitos estudos estão sendo realizados utilizando partes não comestíveis da planta, como por exemplo, palhas e talos, como matéria prima lignocelulósica na produção de etanol de 2<sup>a</sup> geração.<sup>4</sup>

Outra alternativa para o uso de recursos naturais renováveis sem gerar uma competitividade com as indústrias de alimentos, é a obtenção de uma biomassa com fins exclusivos para a produção de etanol, como é o caso da cultivar de arroz BRS AG, desenvolvida pela Embrapa Clima Temperado.<sup>9</sup> Essa cultivar de arroz irrigado apresenta peso médio de mil grãos de 52 g, o que corresponde a aproximadamente o dobro do valor das cultivares convencionais de arroz irrigado no Brasil, cujo peso médio de mil grãos é de 25,6 g. Além disso, com relação ao potencial genético de produtividade, o arroz BRS AG apresenta rendimento médio de 8193 kg·ha<sup>-1</sup>, valor próximo ao rendimento médio para o arroz BRS Pampa, que corresponde a 9215 kg·ha<sup>-1</sup>. O arroz BRS AG apresenta grãos muito grandes, não são do tipo longos e finos, e possuem uma baixa relação de amilose-amilopectina, que resulta em uma qualidade inferior no cozimento, não se enquadrando nos padrões da indústria e do consumo brasileiro. Dessa forma, trata-se da primeira cultivar de arroz destinada à produção de etanol ou a alimentação animal, e não ao consumo humano.<sup>10</sup>

Com isso, realizou-se o estudo sobre o processo de hidrólise do amido presente no arroz BRS AG seguido da fermentação com a levedura *S. cerevisiae*, avaliando-se o potencial de utilização dessa cultivar de arroz como biomassa amilácea para a produção de etanol. Os rendimento e produtividade obtidos foram comparados aos valores resultantes da hidrólise e fermentação com o arroz comercial BRS Pampa.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como principal objetivo a produção de etanol para fins energéticos utilizando como matérias-primas arroz comercial e a cultivar BRS AG (arroz gigante).

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Otimizar as condições de hidrólise do amido presente no arroz comercial
- Avaliar diferentes leveduras industriais buscando o ótimo para a produção de etanol para o arroz comercial e para o arroz gigante (BRS AG)
- Efetuar um estudo comparativo arroz comercial e o arroz gigante (BRS AG) como matéria-prima para produção de etanol.
- Simular o processo de obtenção de etanol de arroz comercial e gigante (BRS AG) com o auxílio do simulador Aspen Plus.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

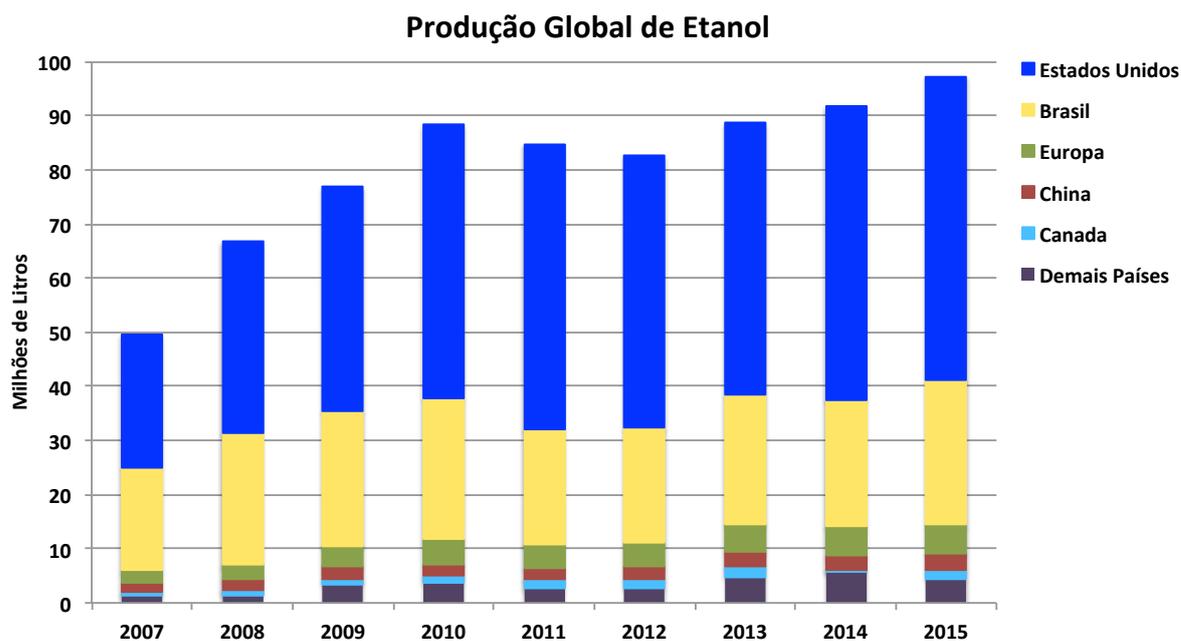
#### 3.1. ETANOL COMBUSTÍVEL

A utilização de biomassas como matérias-primas para a produção de biocombustíveis, como por exemplo biodiesel, biogás e bioetanol, aumenta significativamente com o passar dos anos. Isso porque trata-se de um recurso renovável, de fácil obtenção e com baixo teor de enxofre, e conseqüentemente baixo impacto ambiental.<sup>11</sup>

Além disso, no caso particular do uso de biomassa para obtenção de bioetanol, empregam-se, principalmente, biomassas com grandes quantidades de açúcares facilmente fermentáveis, como por exemplo, a cana-de-açúcar, ou com quantidades elevadas de amido, como por exemplo, o milho.<sup>12</sup> Materiais lignocelulósicos, como resíduos agrícolas e florestais, também podem ser utilizados na produção de etanol de 2ª geração, porém, o rendimento de etanol obtido com esses materiais é menor em comparação com culturas de açúcar ou amido.<sup>13</sup>

O etanol pode ser obtido quimicamente, por meio da hidratação de etileno, ou por meio da ação de microrganismos. Atualmente, a principal rota industrial utilizada em todo o mundo para a produção de etanol combustível é por meio do processo microbiológico, chamado de fermentação alcoólica. Nesse processo, os açúcares são convertidos a etanol, energia, biomassa celular e CO<sub>2</sub>, pelas células de levedura.<sup>14</sup> A principal levedura utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao alto rendimento final de etanol e elevada produtividade ao longo de todo o processo.<sup>11</sup>

Com base em um levantamento realizado pela *Renewable Fuels Association* (RFA),<sup>15</sup> a produção mundial de etanol cresceu nos últimos anos. A maior produção registrada desde 2007 a 2015 ocorreu em 2015, Figura 1, com aproximadamente 97.209.380 litros. Os Estados Unidos e o Brasil são hoje os maiores produtores de etanol combustível, responsáveis por mais de 85% da produção mundial.<sup>16</sup>



**Figura 1.** Produção mundial de Etanol de 2007 a 2015. Adaptada.<sup>15</sup>

Em 2016, os Estados Unidos produziram mais de 58.030 milhões de litros, e o Brasil mais de 27.615 milhões de litros.<sup>15</sup> Entretanto, os Estados Unidos utilizam o amido presente no milho como fonte de carboidrato no processo fermentativo e o Brasil utiliza a sacarose presente na cana-de-açúcar para obtenção de bioetanol.<sup>5</sup>

**Tabela 1.** Produção mundial de etanol em 2016, segundo a *Renewable Fuel Association* (RFA). Adaptada.<sup>15</sup>

País	Produção de Etanol (Milhões de Litros)
Estados Unidos	58.030
Brasil	27.615
União Européia	5.213
China	3.199
Canada	1.650
Tailândia	1.219
Argentina	999
Índia	852
Restante dos Países do Mundo	1.855

### 3.1.1. Produção de Etanol no Brasil

O Brasil é considerado pioneiro na produção e utilização de etanol biocombustível. O país utiliza a cana-de-açúcar como principal matéria-prima no processo fermentativo, no qual ocorre a conversão de açúcar à álcool por ação microbiana.<sup>17</sup>

A cana-de-açúcar foi inicialmente cultivada na região Nordeste do Brasil, pelos portugueses e rapidamente as plantações e usinas se expandiram pelo país. No século XVI, o açúcar era uma mercadoria importante de exportação para o mercado europeu. Em 1580, o país tornou-se o maior produtor de açúcar do mundo.<sup>18</sup> Além do açúcar, a rapadura, a cachaça e o licor do suco da cana-de-açúcar fermentado eram as principais mercadorias oriundas dessa matéria-prima. Porém, em 1970 a cana-de-açúcar passou a ter um novo objetivo estratégico, ser utilizada na produção de etanol para substituir os derivados de petróleo.<sup>19</sup>

Fatores geográficos, políticos, climáticos e econômicos foram determinantes para que os primeiros centros de cultivo de cana-de-açúcar fossem em Pernambuco e na Bahia, porém, atualmente, a região Centro-Sul do Brasil é a maior produtora. O estado de São Paulo é responsável por aproximadamente 60% da produção total, enquanto a região Nordeste só contribui com 11% da produção total de cana-de-açúcar.<sup>18</sup>

A crise do petróleo em 1970, fez com o que Brasil lançasse o programa Proálcool, em 1975, com o objetivo de diminuir a dependência existente em relação às importações de petróleo.<sup>14</sup> Os incentivos gerados pelo Proálcool para a fabricação e utilização do etanol basearam-se em subsídios de preços, desenvolvimento tecnológico de motores movidos por este combustível e na combinação de fatores econômicos. Dentre os principais, destacam-se adição de etanol à gasolina, benefícios financeiros tanto para os consumidores quanto para os produtores rurais e incentivos fiscais para a compra e manutenção de veículos automotivos movidos a etanol.<sup>17</sup>

O surgimento de motores com combustível flex proporcionou ao consumidor o poder de escolha ao abastecer seu veículo, já que os carros flex podem funcionar com 100% de etanol hidratado ou com diferentes quantidades da mistura de etanol e gasolina. Os sensores eletrônicos detectam a mistura de combustível e ajustam de forma automática a combustão do motor.<sup>14</sup>

Conforme a Portaria N° 75, de 5 de março de 2015, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Resolução N° 1, de 4 de março de 2015, do Conselho Internacional do Açúcar e do Álcool (CIMA) o percentual obrigatório de etanol anidro combustível na gasolina comum é de 27%, desde 16 de março de 2015. Além disso, a produção de etanol da cana-de-açúcar é responsável por uma redução de 40% a 62% na emissão dos gases do efeito estufa, em relação à gasolina. Nos grandes centros urbanos, o emprego da mistura etanol e gasolina fez com que a emissão de monóxido de carbono diminuísse de 50 g/km para menos de 5,8 g/km.<sup>14</sup>

Para suprir a demanda de etanol combustível, é importante ressaltar que os avanços científicos e tecnológicos em microbiologia de fermentação contribuíram de forma significativa para a evolução da indústria de produção de etanol no Brasil. Um controle das condições de fermentação é vantajoso já que pode reduzir as condições de *stress* para as células de levedura, bem como diminuir a contaminação por bactérias.<sup>14</sup>

### **3.1.2 Etanol de 2ª Geração**

O aproveitamento de resíduos agrícolas para produção de etanol de 2ª geração tem sido objeto de vários estudos, com o objetivo de agregar valor ao processo industrial de produção desse combustível, bem como utilizar matérias-primas que não sejam competitivas com a indústria alimentícia.<sup>4</sup> Esses materiais lignocelulósicos são fontes abundantes de hidratos de carbono, sendo potencialmente atraentes para as indústrias de etanol. A palha de arroz, por exemplo, é um subproduto bastante abundante no plantio de arroz, podendo ser utilizada como matéria prima de baixo custo na produção de bioetanol.<sup>20</sup>

Biomassas lignocelulósicas são constituídas por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e a hemicelulose podem ser despolimerizadas a açúcares fermentáveis como a glicose, a hexose e a manose por meio de reações de pré-tratamento e hidrólise química ou hidrólise enzimática.<sup>21</sup> No entanto, a produção de etanol a partir desses materiais apresenta alguns desafios. O alto consumo de energia, bem como a necessidade de equipamentos especiais restringem o processo de pré-tratamento desses materiais, no qual deseja-se remover a lignina

que une os polímeros de carboidratos. Durante a etapa de sacarificação, utiliza-se um complexo enzimático de celulasas que, muitas vezes, encarece o processo.<sup>22</sup>

Nos últimos anos, vários métodos físicos e químicos foram desenvolvidos para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica visando à obtenção de açúcares fermentáveis. Porém, a maioria desses métodos necessita de alta temperatura, alta pressão ou quantidades elevadas de produtos químicos, que podem ser tóxicos para as enzimas e microrganismos fermentativos. O método físico mais utilizado é a explosão a vapor e, em escala laboratorial o microondas. O pré-tratamento químico ocorre com o emprego de ácidos diluídos em reações de hidrólise ácida com alta temperatura.<sup>22</sup> Entretanto, formam-se compostos inibidores com concentrações relativamente elevadas, incluindo o furfural hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, ácido fórmico, ácidos levulínicos e vanilina. Esses inibidores desfavorecem o crescimento microbiano, o metabolismo e a produção de etanol combustível. A remoção desses compostos inibidores requer etapas subsequentes de purificação (remoção de inibidor), o que aumenta o tempo do processo e eleva os custos de produção, podendo ser economicamente inviável para a indústria de bioetanol.<sup>20</sup>

Contudo, o aproveitamento de materiais lignocelulósicos pode ser vantajoso, uma vez que no Brasil, grandes quantidades desses materiais provenientes da cana-de-açúcar são descartados como lixo residual, que podem ser utilizados para aumentar a produtividade e agregar valor ao etanol combustível. Como essas biomassas já estão disponíveis na cana-de-açúcar, a produção de etanol de segunda geração pode utilizar parte da infraestrutura requerida na produção de etanol de primeira geração.<sup>5</sup>

### **3.2. ETANOL DE AMIDO**

A produção de etanol combustível a partir de biomassas que apresentam em sua composição grande quantidade de amido têm se mostrado bastante eficiente.<sup>7</sup> Alguns países da Europa, América do Norte e Ásia Central já estão utilizando essas matérias-primas para fins energéticos. Isso porque, regiões de clima temperado são favoráveis ao plantio e cultivo de biomassas amiláceas, como por exemplo, milho, mandioca e batata-doce.<sup>3</sup>

O milho é a biomassa amilácea mais utilizada na produção de bioetanol. Seus grãos são constituídos por aproximadamente 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4 % de óleo.<sup>23</sup> Atualmente, os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol combustível e utilizam o milho como matéria-prima. Só em 2016, o país foi responsável por aproximadamente 58% da produção mundial de etanol.<sup>16</sup>

A mandioca é um tubérculo rico em amido, com forte potencial para uso nas indústrias sucroalcooleiras. Uma das vantagens associada ao emprego desse tubérculo está no plantio. As destilarias à base de açúcar são sazonalmente operadas, em contrapartida, as usinas que utilizam a mandioca como matéria-prima, podem ser operadas durante todo o ano devido ao rápido crescimento.<sup>7</sup> O Vietnã é um dos produtores de etanol a partir do amido presente na mandioca. Até 2010, o país possuía 8 usinas de etanol, com capacidade máxima de produção de 680 milhões de litros por ano. Desse total, 62% com fins exclusivos para biocombustíveis, e o restante distribuídos para as indústrias alcoólicas, farmacêuticas, cosméticas e para exportação.<sup>24</sup>

Outro tubérculo que apresenta grande quantidade de amido é a batata doce. Sua boa adaptabilidade a diferentes altitudes e tipos de solo atrelado aos baixos custos necessários para o plantio e colheita, tornam-na atrativa para ser adotada como matéria prima nas indústrias de bioetanol.<sup>25</sup> A China utiliza a batata doce como principal biomassa na produção de etanol combustível já que o país é responsável por cerca de 85% da produção mundial desse tubérculo.<sup>26</sup> Por ano, o país produz mais de 100 milhões de toneladas de batata doce.<sup>27</sup>

### **3.2.1. Arroz como Matéria-prima**

O arroz é um grão com potencial para utilização como biomassa na produção de etanol devido a grande quantidade de amido presente em sua composição. Atualmente, o arroz constitui a base da dieta diária de mais da metade da população mundial, sendo fonte de vitaminas e minerais.<sup>28</sup> Anualmente, estima-se que a produção global de arroz seja cerca de 480 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 4,4 toneladas por hectare e uma área colhida de aproximadamente 160 milhões de hectares.<sup>29</sup> A Ásia é responsável por 80% do cultivo global.<sup>30</sup> O Brasil é o maior produtor de arroz fora da Ásia, e o 9º maior produtor mundial. Em 2015, o país produziu em média 12,5 milhões de toneladas,

sendo que 8,7 milhões de toneladas foram produzidas no estado do Rio Grande do Sul. A região possui clima e solos hidromórficos ideais para o cultivo do arroz irrigado, sendo responsável pelo cultivo de 1,1 milhões de hectares por ano.<sup>31</sup>

O arroz constitui uma fonte importante de carboidratos por possuir grande quantidade de amido em sua composição, além de conter quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas.<sup>29</sup> Fatores genéticos, ambientais, variações de manejo, processamento e de armazenamento fazem com que a composição do grão e de suas frações sofram variações. Estudos apontam que a concentração de amido no arroz integral de diferentes cultivares varia de 72% a 82%.<sup>32</sup> O percentual de amido presente em grãos de arroz branco polido é de aproximadamente 90%.<sup>28</sup> O arroz parboilizado polido possui cerca de 85% de amido.<sup>32</sup> A Tabela 2 apresenta os componentes presente no arroz branco polido com suas devidas porcentagens.

**Tabela 2.** Composição aproximada do arroz branco polido.<sup>28</sup>

Componentes	% (m/m)
Amido	90
Proteínas	7,5
Fibras	0,6
Minerais	0,5

A utilização do arroz para produção de etanol pode afetar significativamente no preço comercial desse grão nas indústrias alimentícias. Com objetivo de evitar a concorrência entre esses dois setores, combustível e alimento, a Embrapa Clima Temperado, localizada na região Sul do Brasil, desenvolveu um arroz exclusivamente para a produção de álcool de cereais e para alimentação animal.<sup>9, 10</sup> Trata-se da cultivar BRS AG, também chamado arroz gigante devido ao tamanho dos grãos. A cultivar BRS AG é resultante de um cruzamento simples, que envolveu como genitores a cultivar americana Gulfmont de arroz irrigado e a linhagem *super large grain* (SLG1) de origem japonesa.<sup>33</sup> Trata-se da primeira cultivar de arroz irrigado desenvolvida para outros fins, e não consumo humano. Isso porque seus grãos não são do tipo longos e finos, são muito grandes e possuem baixa relação de amilose-amilopectina, (polissacarídeos presentes no amido), que resulta em uma

qualidade inferior no cozimento, não se enquadrando nos padrões da indústria e do consumo brasileiro. O alto teor de amilose ocasiona aglutinação dos grãos após o processo de cocção. Com isso, o arroz gigante é denominado Desclassificado para Consumo Humano (DCH). O ciclo biológico, da emergência à maturação é em torno de 126 dias, a altura média das plantas é de 110 cm e a espessura do colmo é de 5,5 mm, o que lhe confere colmos fortes e resistentes ao acamamento. O peso médio de mil sementes é de 52 g, enquanto a maioria das cultivares de arroz irrigado apresenta peso médio de 25,6 g. Seus grãos são extremamente farináceos, e sua produtividade é superior a 12 toneladas por hectare, o que corresponde a quase o dobro das cultivares tradicionais. Além da alta produtividade, e da não utilização na alimentação humana, seus grãos possuem grande quantidade de amido, tornando-o bastante atrativo para produção de bioetanol.<sup>9, 10</sup>



**Figura 2.** Comparação dos grãos da cultivar de arroz convencional BRS Pampa (esquerda) com os grãos da cultivar BRS AG “Gigante” (direita).<sup>9</sup>

### 3.3. AMIDO

O amido é o carboidrato de reserva energética mais comum nas plantas e um dos principais produtos agroindustriais. Anualmente, são produzidos cerca de 2 bilhões de toneladas de amido a partir de cereais.<sup>29</sup> Além disso, é a fonte de carboidratos mais importante e presente na alimentação humana, correspondendo de 80% a 90% de todos os polissacarídeos consumidos.<sup>34</sup>

Em grãos de cereais, o amido corresponde de 40% a 90% do peso seco, em leguminosas de 30% a 50% do peso seco, em tubérculos de 65% a 85 do peso seco e em frutas ainda não maduras de 40% a 70% do peso seco.<sup>34</sup>

Estruturalmente, trata-se de um polímero constituído por dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina, com unidades de  $\alpha$ -D-glicose unidas sucessivamente.<sup>35</sup> As proporções desses polissacarídeos diferem em relação ao tipo de planta, variedades de uma mesma espécie e de acordo com seu grau de maturação.<sup>34</sup> A Tabela 3 apresenta a porcentagem de amilose e amilopectina de algumas fontes vegetais.

**Tabela 3.** Teor de amilose e amilopectina presentes em alguns amidos naturais. Adaptada.<sup>36</sup>

Fonte Vegetal	Amilose (%)	Amilopectina (%)
Milho	25	75
Batata	23	77
Arroz	15 - 25	75 - 85
Trigo	20	80
Mandioca	16 - 20	80 - 84
Inhame	30	70
Aveia	16 - 33	67 - 84

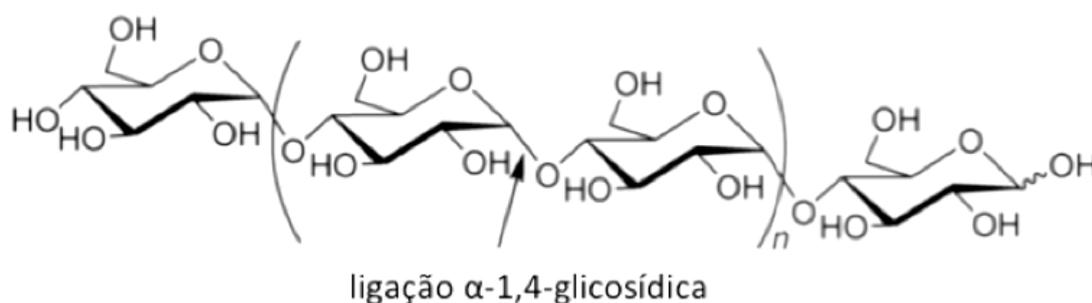
O amido é depositado nas plantas em forma de grânulos, cujas dimensões e formato podem variar de acordo com a espécie vegetal. O diâmetro desses grânulos pode estar entre menos de 1  $\mu$ m a mais de 100  $\mu$ m e seu formato pode ser angular, oval, redondo, esférico ou irregular.<sup>29</sup> Além disso, os grânulos de amido possuem caráter semicristalino, ou seja, apresentam regiões cristalinas e regiões menos amorfas, e apresentam birrefringência quando em solução aquosa e observados em microscópio óptico sob luz polarizada.<sup>36</sup> Possuem um centro, também chamado de “hilum”, considerado o ponto original de crescimento do grânulo.<sup>34</sup>

O amido além de ser fonte de carboidrato na alimentação humana e animal, é utilizado como matéria prima nas indústrias têxtil, na produção de materiais termoplásticos biodegradáveis, bem como na produção de fármacos. Além disso, é utilizado nas indústrias como espessante, estabilizador de coloides, agente gelificante e de volume, adesivo, entre outras aplicações.<sup>34</sup>

### 3.3.1 Amilose

A amilose é um polímero com cadeia linear, constituída por várias moléculas de  $\alpha$ -glicose unidas por meio de ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas. Porém, pode possuir algumas ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídica, mas como suas ramificações são separadas por longas distâncias, suas propriedades são as de uma molécula linear.<sup>37</sup> A maioria dos amidos contem de 20% a 25% de amilose na sua composição.<sup>38</sup> Entretanto, alguns cereais denominados cerosos podem não possuir amilose, como por exemplo, milho ceroso.<sup>34</sup>

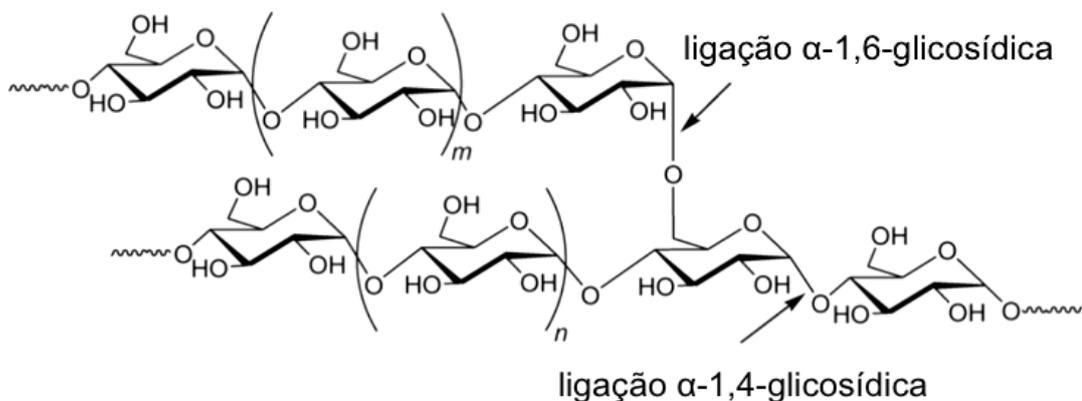
As moléculas de amilose possuem aproximadamente massa molecular entre  $10^5$  e  $10^6$ , número médio de grau de polimerização de 324 a 4920 unidades de glicose, com 9 a 20 pontos de ramificação, o que equivale de 3 a 11 cadeias por molécula. A estrutura e o tamanho da amilose diferem de acordo com a origem botânica.<sup>37</sup>



**Figura 3.** Representação estrutural da amilose e da ligação  $\alpha$ -(1-4)-glicosídica. Adaptada.<sup>39</sup>

### 3.3.2 Amilopectina

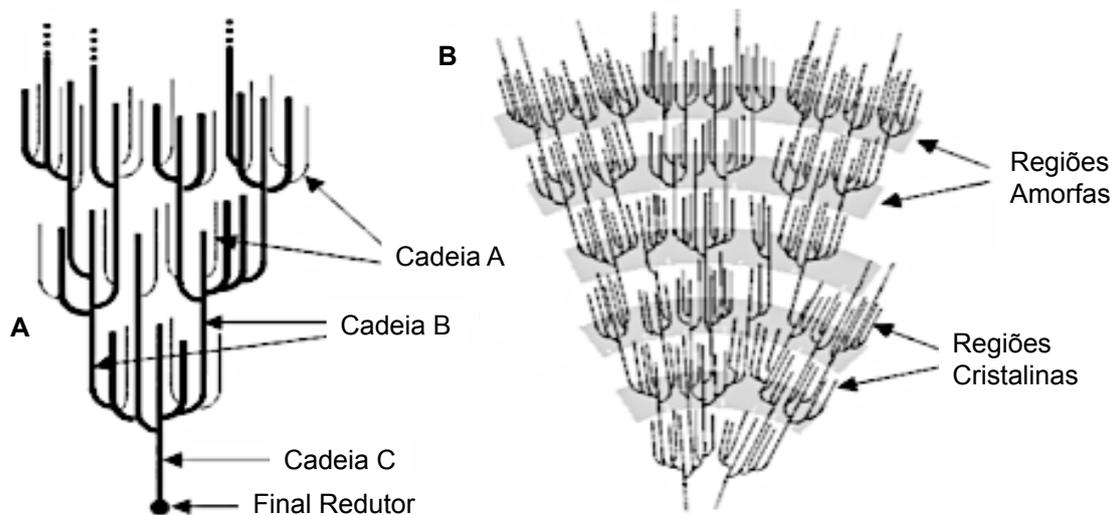
A amilopectina é um polissacarídeo ramificado, formada por unidades de  $\alpha$ -glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, e ramificações provenientes de ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídicas.<sup>39</sup> Comparando com a amilose, a amilopectina é uma molécula muito maior, com massa molecular entre  $10^7$  a  $10^9$ , e com muitas ramificações. A sua estrutura molecular possui aproximadamente 95% de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e 5% de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Possui grau de polimerização entre 9600 a 15.900 unidades de glicose, e assim como a amilose, a estrutura molecular, a forma e o tamanho variam de acordo com a origem botânica.<sup>37</sup>



**Figura 4.** Representação estrutural da amilopectina com ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e ligação  $\alpha$ -(1-6)-glicosídica. Adaptada.<sup>39</sup>

Estruturalmente, a parte linear das moléculas da amilopectina, resultante das ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), forma estruturas helicoidais duplas, que são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas, levando a formação de regiões cristalinas. Porém, os grânulos de amido também apresentam regiões amorfas, constituídas pelas ramificações da amilopectina, resultante das ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), e pelas cadeias da amilose.<sup>36</sup>

As cadeias da amilopectina são organizadas e classificadas de três formas, A, B e C, conforme Figura 5. A classificação tipo A, é composta por uma cadeia não redutora de glicose, unidas por meio de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Estas por sua vez, são unidas a uma cadeia tipo B por meio de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). As cadeias tipo B são compostas por unidades de glicose ligadas em posições  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), possuindo uma ou mais cadeias do tipo A e podendo conter cadeias do tipo B unidas por meio de um grupo hidroxila. Por fim, uma molécula de amilopectina possui apenas uma cadeia C, composta por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), com um grupamento terminal redutor.<sup>34</sup>



**Figura 5.** A) Estrutura e classificação das cadeias da amilopectina em A, B e C. B) Amilopectina estruturalmente, formando regiões amorfas e cristalinas nos grânulos de amido. Adaptada.<sup>34</sup>

A amilopectina está presente em todos os grânulos de amido, sendo responsável por aproximadamente 75% da sua composição. Normalmente, é o polissacarídeo predominante e em alguns casos, é o único componente presente no amido (amido ceroso).<sup>40</sup>

### 3.4. HIDRÓLISE DE BIOMASSAS AMILÁCEAS

A produção de etanol combustível a partir de matérias primas amiláceas requer que uma etapa de hidrólise do amido à açúcares monoméricos fermentáveis anteceda a fermentação.<sup>41</sup>

A hidrólise pode ser feita por processo químico ou biológico. A escolha em realizar a hidrólise do amido quimicamente, com a utilização de ácidos inorgânicos diluídos, ou biologicamente, com emprego de enzimas, é realizada levando-se em consideração vantagens e desvantagens associadas a cada processo.<sup>42</sup>

A utilização de ácidos inorgânicos, como por exemplo, ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, possui como vantagens elevadas velocidades de reação, pré-tratamento simples das matérias-primas amiláceas, utilização de um catalisador ácido facilmente disponível e de baixo custo. As desvantagens existentes perante

essa hidrólise são as condições drásticas de reação (pH e temperatura), o possível efeito inibitório dos subprodutos no crescimento celular das leveduras, a neutralização de hidrolisado antes da fermentação, e a utilização de materiais e equipamentos resistentes a ácidos.<sup>42</sup>

A hidrólise enzimática possui como principais vantagens as condições brandas de reação, inerente a ausência de reações secundárias, e a especificidade das enzimas, proporcionando a formação de produtos com propriedades químicas e físicas mais definidas.<sup>42</sup> Além disso, as enzimas são compostos naturais, biodegradáveis e que não ocasionam danos ambientais.<sup>43</sup> No entanto, o custo das enzimas, bem como os requisitos para mão-de-obra especializada e laboratórios bem equipados são algumas desvantagens inerentes a esse processo.<sup>42</sup> Porém, mesmo diante a esses fatores adversos, as amilases, enzimas catalisadoras no processo de hidrólise do amido, são mais utilizadas em comparação aos ácidos inorgânicos.<sup>7</sup>

A conversão do amido em açúcares fermentáveis ocorre em três etapas. Primeiramente, 20% a 40% do amido é gelatinizado a temperatura de aproximadamente 100 °C por cerca de 5 a 10 minutos.<sup>41</sup> A etapa seguinte corresponde a liquefação do amido por meio da utilização de uma enzima termoestável, a  $\alpha$ -amilase.<sup>3</sup> Essa enzima é obtida a partir de bactérias termo-resistentes como a *Bacillus licheniformis* ou por meio de cepas modificadas de *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*.<sup>7</sup> A  $\alpha$ -amilase é uma endoamilase, ou seja, trata-se de uma enzima capaz de clivar as ligações  $\alpha$ -1,4- glicosídicas da amilose e da amilopectina em posições internas (endo), levando a formação de oligossacarídeos com diferentes comprimentos e oligossacarídeos ramificados, chamados dextrinas.<sup>44</sup> As ligações  $\alpha$ -1,4 são clivadas de forma aleatória. Nessa etapa, a suspensão deve ser mantida a uma elevada temperatura, de 90 °C a 110 °C para quebra das moléculas de amido.<sup>7</sup>

A terceira etapa consiste na sacarificação dessas dextrinas, levando a obtenção de açúcares monoméricos, glicose.<sup>3</sup> Esta reação é catalisada pelas exoamilases, como a amiloglucosidase, que é capaz clivar as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6- glicosídicas nos pontos de ramificação, liberando unidades de  $\beta$ -D-glicose do substrato polimérico.<sup>44</sup> Nessa etapa, a maltotriose e a maltose são hidrolisadas a uma taxa mais baixa em comparação as cadeias maiores de oligossacarídeos. Além

disso, as ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídicas são clivadas mais lentamente do que as ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas.<sup>45,46</sup> As amiloglucosidases são geralmente obtidas a partir de *Aspergillus niger* ou *Rhizopus species*.<sup>7</sup> A reação de sacarificação ocorre normalmente a 60 °C, visto que essa é a temperatura ideal de atividade da amiloglucosidase, levando a uma maior conversão de glicose, e posterior maior rendimento de etanol.<sup>12</sup>

### 3.5. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um conjunto de reações bioquímicas no qual microrganismos atuam na transformação de açúcares à etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).<sup>14</sup> A presença de açúcar, a utilização de microrganismos capazes de atuar na transformação de açúcar à etanol e dióxido de carbono e a ausência de oxigênio são fatores fundamentais os quais interferem no rendimento final da fermentação.<sup>19</sup> Entre vários microrganismos já explorados para a produção de etanol, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se, já que proporciona uma fermentação uniforme, com elevado rendimento final de etanol e alta produtividade ao longo do processo.<sup>11</sup>

A produção de bioetanol a partir do processo fermentativo depende de fatores como temperatura, pH, concentração de açúcar, tempo de fermentação, taxa de agitação.<sup>16</sup> A temperatura ótima produtiva da *S. cerevisiae* é de 26 °C a 35 °C. O aumento da temperatura pode levar a uma contaminação bacteriana, que pode resultar na floculação, na redução da viabilidade celular das leveduras, e na diminuição do rendimento do processo. Uma contaminação bacteriana com concentração superior a 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colônias por mL pode resultar em uma redução de 1% a 5% do rendimento do processo.<sup>47</sup>

A escolha de qual microrganismo utilizar na fermentação alcoólica em escala industrial deve ser feita levando-se em consideração sua capacidade de converter o substrato em produto em um menor tempo, com altos rendimentos de etanol e produtividade, bem como menor formação de coprodutos, como por exemplo, ácido acético.<sup>48</sup> A estabilidade do agente biológico diante as condições reacionais como elevada pressão osmótica do meio, elevada temperatura e elevada força iônica e a capacidade de ser resistente a substâncias tóxicas que podem ter sido geradas no

processo de tratamento da matéria-prima ou que estejam presentes em resíduos e efluentes são fatores que também devem ser levados em consideração.<sup>49</sup>

Nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se obter outro microrganismo capaz de produzir etanol com algumas vantagens diante a *S. cerevisiae*. Nesse contexto, a bactéria *Zymomonas mobilis* mostra-se bastante promissora, porém a levedura *S. cerevisiae* ainda é a mais utilizada.<sup>50</sup>

A principal via metabólica envolvida no processo fermentativo é a glicólise, onde uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são formadas, liberando hidrogênio e energia na forma de ATP. Quando a fermentação ocorre em condições anaeróbicas (ausência de oxigênio), o piruvato é reduzido a etanol, com a liberação de CO<sub>2</sub> e formação de duas moléculas de ATP.<sup>50</sup>

De acordo com a equação de Gay-Lussac para essa etapa de glicólise, onde 1 mol de glicose (180 g) produz 2 mols de etanol (92 g), 2 mols de dióxido de carbono (88 g) e 57 kcal de energia. Em condições aeróbicas (presença de oxigênio), ocorre um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde é oxidado a dióxido de carbono e água.<sup>51</sup>

Equação Gay-Lussac:



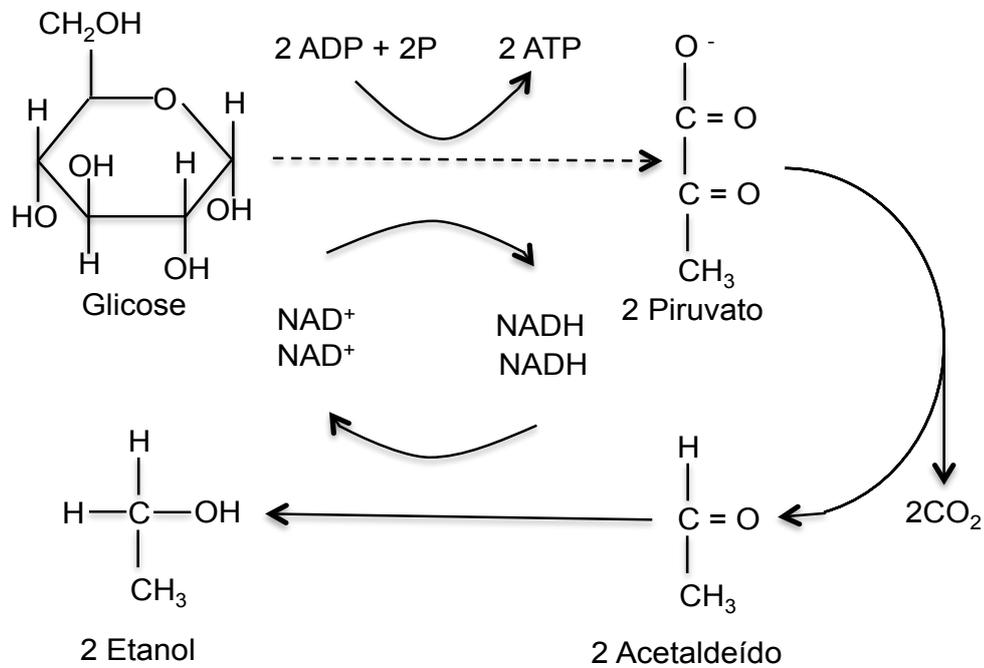
Ciclo de Krebs:



Dessa forma, o rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> (51%). A formação de coprodutos, como glicerol e álcoois superiores, necessários para a síntese de material celular e manutenção da levedura, faz com que, na prática, não se obtenha esse valor para o rendimento de etanol.<sup>51</sup>

A primeira etapa da fermentação alcoólica corresponde a fosforilação do açúcar. Caso o açúcar presente seja a glicose ou a frutose, a fosforilação ocorre por meio das enzimas hexoquinase. A enzima glucoquinase fosforila somente a glicose. Os açúcares fosforilados são metabolizados, levando a formação de duas moléculas

de piruvato, via glicólise. O piruvato por sua vez, é descarboxilado a acetaldeído por meio da enzima piruvato descarboxilase, e, em seguida, reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase.<sup>49</sup>



**Figura 6.** Representação do processo de fermentação alcoólica da glicose, levando a formação de duas moléculas de etanol e liberando dióxido de carbono. Adaptada.<sup>52</sup>

Durante o processo fermentativo, ocorre o crescimento de células de levedura. Isso porque duas moléculas de ATPs produzidas na glicólise são utilizadas para conduzir a biossíntese celular das leveduras. Dessa forma, a levedura produzida é um coproduto associado a produção de etanol. Outros subprodutos também podem ser produzidos durante a fermentação do etanol e, entre eles, o glicerol é o principal. Alguns fatores como pH elevado e pressão osmótica elevada podem estimular a formação desses subprodutos. A formação desses subprodutos e o crescimento de células da levedura utilizada podem diminuir o rendimento final de etanol.<sup>50</sup>

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. REAGENTES

As reações de hidrólise enzimática das amostras de arroz comercial e arroz BRS AG foram realizadas em meio tamponado. Na solução tampão 0,1 M de citrato de sódio, pH 5,5 foram utilizados: ácido cítrico, grau P.A.; citrato de sódio dihidratado, com pureza P.A.; e água destilada.

A hidrólise do amido presente nas amostras de arroz foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, referente a liquefação, utilizou-se a enzima  $\alpha$ -amilase Termamyl 2X, fornecida pela Novozymes. Posteriormente, utilizou-se a enzima amiloglicosidase AMG 300 L, fornecida pelas Novozymes, para a sacarificação e obtenção da glicose.

Preparou-se o meio de cultura para crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando: peptona bacteriológica; extrato de levedura em pó; D(+) glicose anidra, grau de pureza P.A.; agar; água destilada.

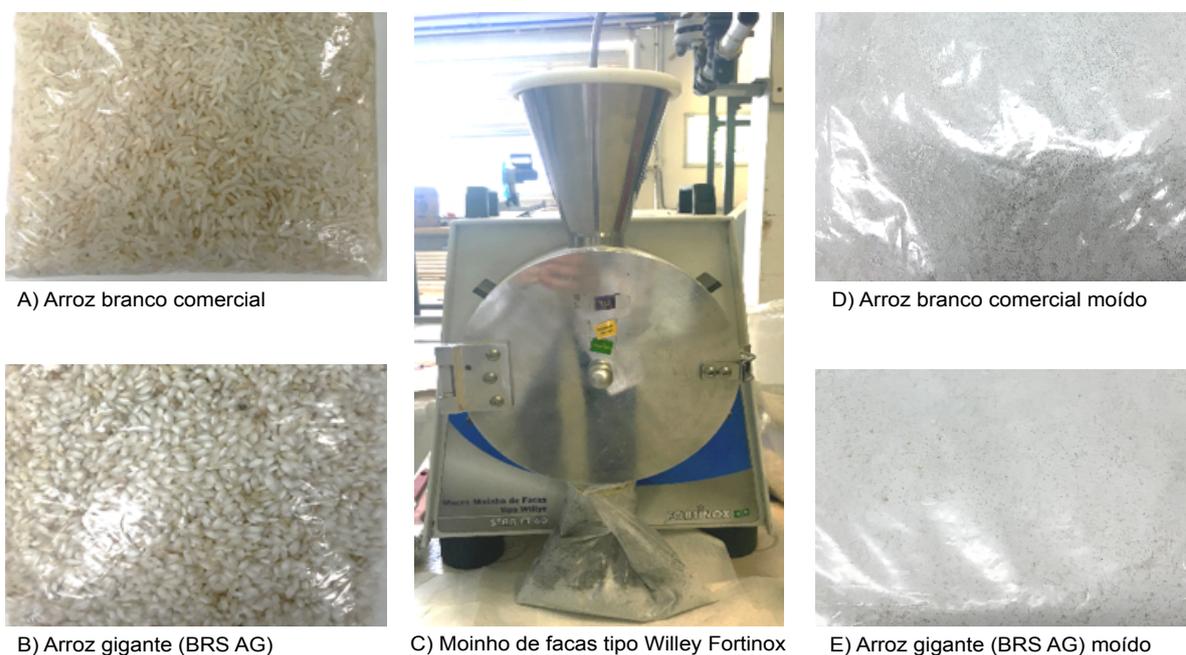
A quantificação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* do meio de cultura foi feita empregando-se a Câmara de Neubauer, sendo necessário o preparo de algumas soluções. Para a solução tampão fosfato, os reagentes usados foram: fosfato de sódio monobásico anidro, 98% P.A.; fosfato de sódio bibásico, grau de pureza 98,5%; água destilada estéril. A solução estoque de eritrosina foi preparada com eritrosina e água destilada estéril.

Para a quantificação da glicose obtida após reação de hidrólise, bem como quantificação dos produtos da fermentação, análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas no equipamento Infinity 1260 Agilent Technology, com coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (BioRad). A fase móvel para essa coluna cromatográfica corresponde uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M, preparada em capela de exaustão, com ácido sulfúrico com grau de pureza 97,8%, e água destilada purificada em um sistema Milli-Q. A cada utilização do equipamento CLAE para quantificação de açúcares ou etanol, eram preparados 2 L de solução de ácido sulfúrico. A solução era transferida para um frasco reagente de 2 L, e submetida à ultrassom no equipamento Banho Ultrassônico, por 15 minutos para desgaseificação da solução.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. MOAGEM DAS MATÉRIAS-PRIMAS

As amostras de arroz comercial BRS Pampa e arroz da cultivar BRS AG, foram moídas em Moinho de Facas tipo Willey Fortinox Star FT-60, com tamanho granulometria de  $696,8 \pm 25,4 \mu\text{m}$ .



**Figura 7.** Arroz comercial (A) e arroz gigante (B) antes de passarem pelo moinho de facas tipo Willey Fortinox (C) e após moagem, (D, E), respectivamente.

### 4.2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

#### 4.2.2.1. Otimização do Processo de Hidrólise Enzimática

O presente trabalho propôs uma otimização do processo de hidrólise enzimática do amido contido no arroz comercial, para posterior utilização da melhor condição reacional nas reações de hidrólise do arroz comercial e do arroz gigante (BRS AG) para reações de fermentação com a levedura *S. cerevisiae*.

As reações de hidrólise do amido presente nas amostras de arroz comercial foram realizadas em meio tamponado e em um Sistema de Fermentação da marca Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock.

Primeiramente, preparou-se a solução tampão citrato de sódio 0,1 M com pH 5,5. A concentração de interesse de amido na solução do tampão com o arroz moído era de 120 g/L, assumindo que a quantidade de amido presente no arroz comercial é de aproximadamente 80%. A mistura foi transferida ao frasco reator. O sistema foi então aquecido a uma temperatura de 90 °C e colocado sob agitação. Ao atingir a temperatura, adicionou-se ao frasco reator a enzima Termamyl 2X, 10 vezes em excesso em relação a dosagem recomendada pelo fabricante Novozyme.

O tempo de ação da  $\alpha$ -amilase na etapa de liquefação do amido variou conforme cada reação de hidrólise, com o objetivo de conhecer as melhores condições reacionais para o processo. Informações do fabricante das enzimas (Novozymes) foram adotadas para os fatores temperatura e pH do meio.<sup>53</sup> Realizou-se uma reação de hidrólise na qual essa enzima não foi utilizada, bem como hidrólises nas quais a enzima Termamyl 2X atuou por 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas.

Transcorrido o tempo de ação da enzima, corrigiu-se o pH da mistura para 4,5 com a adição de uma solução de ácido cítrico 1 M, e esperou-se o sistema resfriar e atingir uma temperatura de 60 °C, visto que essas são as condições ótimas de ação da amiloglicosidase.<sup>54</sup> Adicionou-se a enzima AMG 300 L, 10 vezes em excesso em relação a dosagem recomendada pelo fabricante Novozyme, e a reação de sacarificação transcorreu por mais 3 horas. A melhor condição reacional foi determinada levando-se em consideração a quantidade final de glicose, conforme quantificação por CLAE.

#### **4.2.2.2. Hidrólise Enzimática das Amostras de Arroz Comercial e Arroz BRS AG**

As reações de hidrólise do amido presente nas amostras de arroz comercial e arroz gigante previamente moídos foram realizadas em meio tamponado. Inicialmente, preparou-se uma solução de citrato de sódio 0,1 M e uma solução de ácido cítrico 0,1 M. Com a utilização do pHmetro, determinou-se o pH da solução de citrato de sódio, e adicionou-se lentamente, a solução de ácido cítrico 0,1 M, até

obtenção do pH 5,5. As hidrólises enzimáticas das amostras de arroz comercial e arroz BRS AG foram realizadas separadamente, porém seguindo o mesmo procedimento.

A concentração de amido desejada na mistura do tampão citrato de sódio com cada arroz moído era de 120 g/L, assumindo que a quantidade de amido presente em ambos os arrozes é de aproximadamente 80%, ou seja, em 100 g de arroz 80 g é amido. Dessa forma, adicionou-se, a um béquer previamente tarado o arroz moído e a solução tampão 0,1 M de citrato de sódio, com pH 5,5. Montou-se um sistema com placa de aquecimento com controlador de temperatura e homogeneizador (Figura 8). Sob a placa de aquecimento colocou-se o béquer com a solução de arroz e tampão citrato de sódio. A mistura foi aquecida até a temperatura de 90 °C, sob agitação. Ao atingir essa temperatura, adicionou-se a enzima Termamyl 2x em excesso, para atuação na liquefação do amido. Transcorrido o tempo de ação dessa  $\alpha$ -amilase, corrigiu-se o pH das misturas para 4,5 com a adição de uma solução de ácido cítrico 1 M, e esperou-se a temperatura diminuir para 60°C, visto que essas são as condições ótimas de ação da amiloglicosidase.<sup>54</sup> Adicionou-se a enzima AMG 300 L em excesso, ao sistema e a reação de sacarificação transcorreu por mais 3 horas. Amostras retiradas a cada uma hora de reação da hidrólise foram posteriormente analisadas por CLAE, para quantificação da glicose final obtida.



**Figura 8.** Sistema reacional utilizado para as hidrólises enzimáticas do amido presente no arroz comercial e no arroz gigante BRS AG. Onde: (A) béquer com a mistura reacional (arroz previamente moído e tampão citrato de sódio), (B) placa de aquecimento, (C) homogeneizador.

#### **4.2.3. PREPARO DO MEIO DE CULTURA RICO YPG 10%**

##### **4.2.3.1. Meio de Cultura Líquido YPG 10%**

Preparou-se o meio de cultura líquido YPG 10% para posterior crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Utilizou-se 10 g/L (1%) de extrato de levedura, 20 g/L (2%) de peptona bacteriológica e 20 g/L (2%) de glicose. Inicialmente, solubilizou-se a

glicose em água destilada, para posterior adição dos demais reagentes e homogeneização. A mistura foi transferida para erlenmeyers de vidro de 1000 mL. Os erlenmeyers foram tampados com buchas de algodão, gaze e barbante.

#### **4.2.3.2. Meio de Cultura Sólido YPG 10%**

No preparo do meio de cultura sólido, para posterior crescimento da levedura *S. cerevisiae* em placas de Petri, utilizou-se: 10 g/L (1%) de extrato de levedura; 20 g/L (2%) de peptona bacteriológica; 20 g/L (2%) de glicose; 20 g/L (2%) de agar e água destilada. Primeiramente, solubilizou-se a glicose em água destilada, para posterior adição dos demais reagentes. A mistura foi homogeneizada e transferida para um frasco reagente semiaberto.

Os erlenmeyers com o meio de cultura líquido e o frasco reagente com o meio de cultura sólido foram autoclavados a 121 °C, 1 atm por aproximadamente 30 minutos. Transcorrido esse tempo, esperou a autoclave resfriar para então despressurizá-la para abertura. Assim que a autoclave foi aberta, tampou-se o frasco reagente e vedou-se melhor os erlenmeyers, para evitar contaminação. O meio de cultura sólido YPG 10% do frasco reagente foi vertido nas placas de Petri, em meio estéril, na capela de fluxo laminar.

#### **4.2.4. PREPARO DAS LEVEDURAS**

Diferentes linhagens comerciais de leveduras da espécie *S. cerevisiae* foram avaliadas durante processo fermentativo com o objetivo de se determinar qual microrganismo seria mais apropriado para o processo. As cepas utilizadas nesse estudo foram: BG-1; CAT-1; FT-858; JP-1; PE-2; SA-1, uma vez que tratam-se das leveduras comerciais mais utilizadas no Brasil. A levedura CAT-1 encontrava-se liofilizada, sendo necessário que uma etapa de hidratação dessa levedura antecederesse seu inóculo no meio de cultura rico YPG 10%. As demais leveduras foram retiradas do banco de trabalho da Embrapa Agroenergia, e encontravam-se criopreservadas a -80 °C, em glicerol 20% e YPG, e estavam armazenadas em tubos tipo eppendorf.

#### **4.2.4.1. Hidratação da Levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 Liofilizada**

Em um béquer de 10 mL, pesou-se 0,1 g da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, adicionou-se pequena quantidade de água destilada e misturou-se até completa homogeneização. Transferiu-se a mistura para um balão volumétrico de 25 mL e avolumou-se até o menisco com água destilada. A mistura foi então transferida para um erlenmeyer e colocada no shaker a 30 °C, agitação de 150 rpm durante 2 horas. Posteriormente, as leveduras hidratadas foram plaqueadas com auxílio da alça de platina em placas de Petri que continham meio de cultura sólido YPG 10%, para crescimento celular, em ambiente estéril.

#### **4.2.4.2. Preparo do Inóculo das Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* no Meio de Cultura Rico**

As diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* foram plaqueadas em placas de Petri que continham o meio YPG 10%, e então foram mantidas em estufa a 30 °C por aproximadamente 24 horas, até crescimento de colônias isoladas (Figura 9). O plaqueamento foi feito conforme técnica de esgotamento, no qual dividiu-se a placa de Petri em três setores. Primeiramente a alça de platina foi flambada na chama, esperou-se alguns segundos até que ela resfriasse para coleta dos microrganismos. A alça de platina foi introduzida no frasco eppendorf com as leveduras (no caso das linhagens BG-1, FT-858, JP-1, PE-2, SA-1), e, em seguida, a alça foi conduzida a superfície do primeiro setor da placa com o meio de cultura, depositando os microrganismos sobre essa região em forma de estrias. Flambou-se a alça novamente, para esterilização. Deslizou-se a alça de platina partindo do primeiro setor até plaqueamento do segundo setor da placa de Petri. Por fim, esterilizou-se a alça de platina mais uma vez, para distribuição dos microrganismos no terceiro setor da placa.



**Figura 9.** Placa de Petri após crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1.

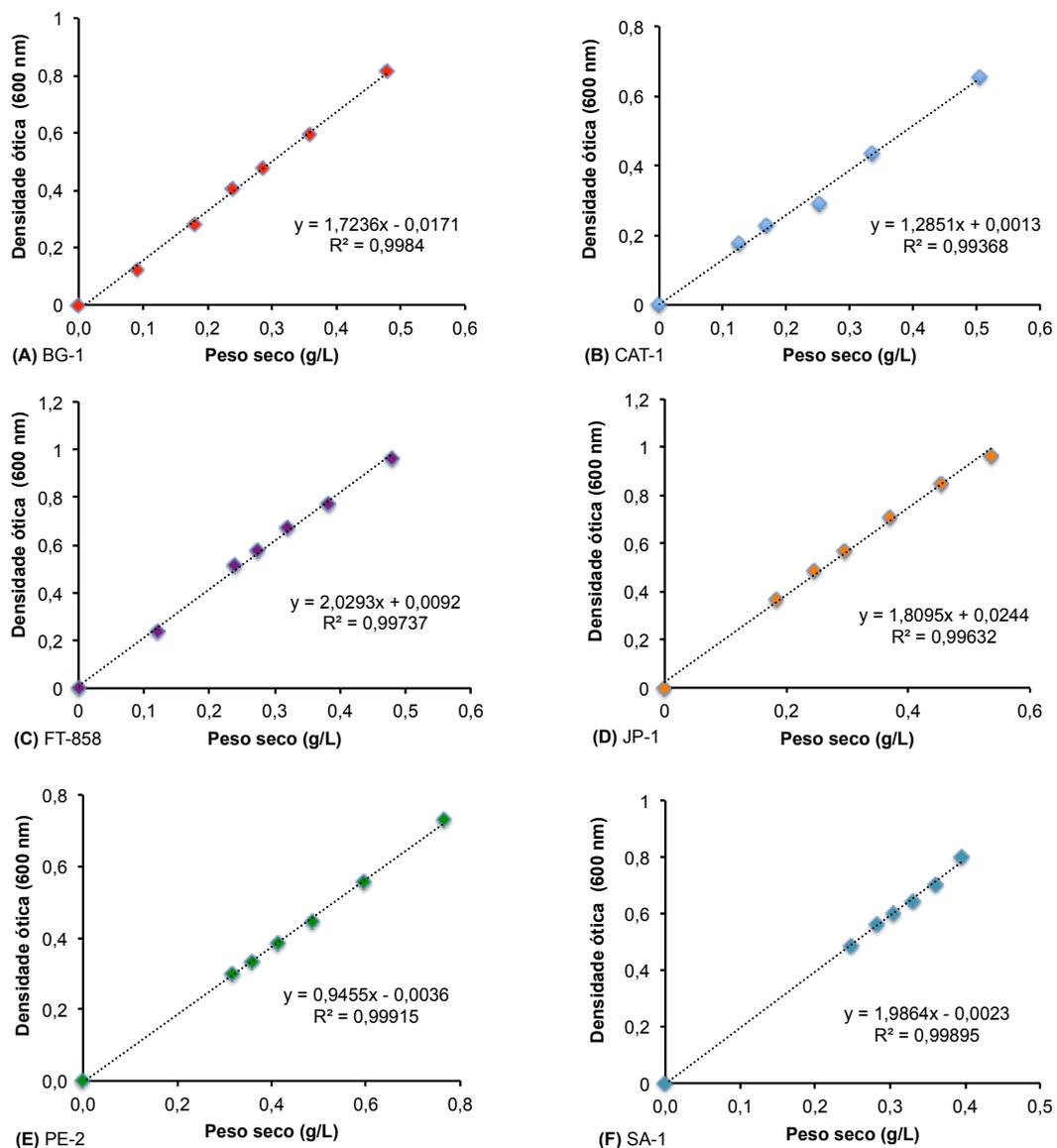
O inóculo das leveduras *S. cerevisiae* foi feito em erlenmeyers com o meio de cultura líquido YPG 10%. O procedimento consistiu em flambar a alça de platina, resfria-la, colher microrganismos de uma colônia pura da placa de Petri, e adicioná-los ao meio de cultura líquido, sendo realizado em ambiente estéril (capela de fluxo laminar). O inóculo era realizado sempre com aproximadamente 16h de antecedência da fermentação. Isso porque os meios de cultura líquidos eram levados ao shaker, à 32 °C e 150 rpm para crescimento celular durante esse período. No dia em que se realizaria a fermentação, determinou-se a viabilidade celular de cada meio com as respectivas linhagens da levedura. Em seguida, o meio com as leveduras contidos nos erlenmeyers era transferido para frascos de centrifuga, para centrifugação a 4700 rpm, por 5 minutos no equipamento Centrífuga de Bancada, da marca Thermo Scientific, modelo Megafuge 40R. O precipitado foi resuspenso, e concentrado em um único frasco esterilizado com o respectivo nome da linhagem, sendo que o sobrenadante foi descartado.

#### 4.2.5. DETERMINAÇÃO PESO SECO DAS LEVEDURAS

Determinou-se a concentração celular das leveduras por meio da técnica de obtenção do peso seco e construção da curva padrão. Pesou-se e identificou-se algumas placas de Petri com o nome das respectivas linhagens da levedura *S. cerevisiae*. As mesmas, foram condicionadas em Estufa com Circulação e Renovação de Ar SL-102, da marca Solab, a 120 °C por 4 horas para remoção de umidade. As placas foram então esfriadas em dessecador por 1 hora. Adicionou-se 1 mL do meio com as leveduras, sendo que para cada linhagem foram utilizadas três placas. Em seguida, pesou-se as placas com o meio. As placas foram colocadas na estufa a 70 °C *overnight*. No dia seguinte, as placas foram resfriadas em dessecador por 1 hora e pesadas. Após registro das respectivas massas, as placas voltaram para a estufa onde permaneceram por mais 2 horas. Após esse período, foram resfriadas em dessecador por 1 hora e novamente pesadas. O procedimento finalizou quando não houve mais variação no valor da massa, sendo possível determinar o peso seco (g) das leveduras e suas respectivas concentrações celular (g/L).

Para determinar a concentração celular de uma levedura em um meio/substrato fermentativo é necessária a construção de uma curva padrão, realizada por meio de espectrofotometria, com os valores de absorbância e concentração celular. Após o inóculo da levedura no meio de cultura rico, uma alíquota foi retirada e desta pequena amostra preparou-se cinco diferentes diluições: 1:8; 1:16; 1:20; 1:32; 1:64. Realizou-se as leituras de absorbância no Espectrofotômetro Spectramax Molecular Devices, da marca Tecnal, com comprimento de onda de 600 nm em cubeta de quartzo. Com os valores das diluições multiplicados pela concentração celular obtida pelo peso seco, e o valor das absorbâncias, foi possível plotar a curva padrão para a determinação da concentração celular de cada linhagem, apresentadas na Figura 10. Dessa forma, obteve-se uma equação da reta para cada levedura.

Estas curvas eram construídas de tempos em tempos para avaliar se a relação massa de levedura e densidade ótica se mantinha constantes.



**Figura 10.** Gráficos de correlação de Peso seco de cada linhagem com a densidade ótica, onde: (A) levedura BG-1; (B) levedura CAT-1; (C) levedura FT-858; (D) levedura JP-1; (E) levedura PE-2; (F) levedura SA-1.

#### 4.2.6. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Determinou-se a viabilidade celular com base no método de Quantificação de Leveduras/Esporos empregando Câmara de Neubauer, no qual contam-se as células de leveduras vivas e mortas, por unidade de volume de uma suspensão. A contagem celular era feita em triplicata, e ao final, realizava-se a média para obtenção do percentual de células vivas.

A câmara de Neubauer é uma lâmina de microscopia com marcações em quadrantes, com medidas conhecidas. A câmara possui dois retículos na porção central, longitudinalmente separador por um sulco profundo sobre a lâmina e transversalmente por quatro sulcos que limitam três plataformas. A plataforma central limitada superiormente por uma lamínula espacial adaptada, colocada firmemente sobre as plataformas laterais. A câmara de Neubauer possui 0,1 mm de profundidade, 25 quadrados, sendo 16 retículos em cada quadrado, 400 retículos totais no quadrante central. Estima-se a concentração de células presentes na amostra analisada com base na área da superfície determinada. Nesse método, uma solução de eritrosina é utilizada, colorindo de rosa as células mortas. As células vivas permanecem incolor, e com base na relação de células incolores (vivas) e células coradas (mortas), estima-se a porcentagem de leveduras vivas em relação à população total.

#### **4.2.6.1 Preparo de Soluções de Trabalho**

A determinação da viabilidade celular requer o uso de algumas soluções, como: solução tampão fosfato; solução estoque de eritrosina; solução de trabalho de eritrosina.

Para o preparo do tampão fosfato, pesou-se 17,90 g de fosfato de sódio bibásico em um béquer de vidro, adicionou-se pequena quantidade de água destilada estéril e com auxílio de um bastão de vidro, misturou-se até completa homogeneização. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250 mL, e avolumou-se com água destilada estéril. Em outro béquer, pesou-se 6,89 g de fosfato de sódio monobásico, adicionou-se pequena quantidade de água destilada estéril, e misturou-se até completa homogeneização. Transferiu-se a solução para um segundo balão volumétrico de 250 mL e avolumou-se com água destilada estéril. As soluções dos dois balões volumétricos foram então misturadas e transferidas para um frasco reagente de 500 mL, o qual foi armazenado sob refrigeração ao abrigo de luz.

A solução estoque de eritrosina foi preparada pesando-se 0,1g de eritrosina em um béquer de vidro e misturando-se com pequena quantidade de água destilada estéril. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e avolumada

com água destilada estéril. Após preparo, a solução estoque foi armazenada em abrigo de luz à 4 °C.

Para a solução de trabalho de eritrosina, adicionou-se 0,1 mL da solução estoque de eritrosina para cada 5,0 mL de tampão fosfato. A solução restante era armazenada ao abrigo de luz e sob refrigeração.

#### **4.2.6.2 Contagem de Células Viáveis de Leveduras**

Antes de iniciar a contagem de células e determinar a porcentagem de células vivas em relação ao número total (células vivas e células mortas) preparou-se a câmara de Neubauer. Limpou-se as plataformas da câmara de contagem com água destilada e fixou-se a lamínula às plataformas da câmara. Após colocar a lamínula, comprimiu-se levemente a mesma sobre as plataformas para obter boa fixação.

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da suspensão de células e 1 mL da solução trabalho de eritrosina. Utilizou-se o agitador de tubos Vortex para homogeneização. Retirou-se 10 µL da solução contida no tubo de ensaio e colocou-se entre o retículo da câmara e a lamínula. Ressalta-se que a amostra foi preparada como uma suspensão de células com um volume conhecido de água destilada estéril. Quando necessário, realizavam-se diluições a partir dessa solução.

Com a câmara de Neubauer já preparada, ajustou-se o Microscópio Trinocular da marca BEL Photonics, para início da contagem celular. Posicionou-se a câmara no microscópio, e obteve-se o foco com a objetiva de 40x. Contaram-se as células incolores (vivas) e as células coradas de rosa (mortas) bem como os brotos contidos nos 25 quadrículos (16 retículos cada um), totalizando 400 retículos. Para evitar contar células a mais que estivessem sobre as linhas laterais, adotou-se o critério: para cada quadrado médio, contaram-se apenas as células que estavam em cima da linha superior e da linha à esquerda.

Ao término da contagem, era necessário realizar a assepsia da câmara e da lamínula, com etanol 70 %, seguida de lavagem com água corrente e sabão. Determinou-se a viabilidade celular conforme equação:

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = \frac{\text{Total de células viáveis (vivas)}}{\text{Total de células (viáveis + não viáveis)}} \times 100$$

## 4.2.7. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE ARROZ COMERCIAL E DE ARROZ GIGANTE

As fermentações foram conduzidas em dois sistemas distintos. Para avaliar o comportamento das diferentes linhagens comerciais de leveduras da espécie *S. cerevisiae*, as reações de fermentações foram conduzidas em erlenmeyer, a 32 °C sob agitação a 150 rpm, em um Shaker Orbital de Solo com Incubação e Refrigeração da Thermo Scientific. Após quantificação dos produtos de fermentação por meio de análise de CLAE, linhagem que apresentou melhor desempenho foi escolhida para ser utilizada nas fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz BRS AG em um sistema de Fermentação modelo Dasgip Bioblock, marca Eppendorf.

### 4.2.7.1. Fermentação em Erlenmeyer e Shaker Orbital

Utilizou-se as linhagens comerciais BG-1, CAT-1, FT-858, JP-1, PE-2, SA-1, para as fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante, realizadas em triplicatas. Dessa forma, os erlenmeyers utilizados nas fermentações foram nomeados conforme a Tabela 4.

**Tabela 4.** Fermentações realizadas em erlenmeyer com as diferentes leveduras e hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante.

BG-1		CAT-1		FT-858	
BG.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	CAT.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	FT.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)			
BG.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	CAT.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	FT.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)			
BG.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	CAT.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	FT.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)			
BG.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	CAT.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	FT.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)			
BG.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	CAT.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	FT.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)			
BG.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	CAT.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	FT.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)			
JP-1		PE-2		SA-1	
JP.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	PE.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)	SA.AC.1 (Arroz comercial replicada 1)			
JP.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	PE.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)	SA.AC.2 (Arroz comercial replicada 2)			
JP.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	PE.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)	SA.AC.3 (Arroz comercial replicada 3)			
JP.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	PE.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)	SA.AG.1 (Arroz gigante replicada 1)			
JP.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	PE.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)	SA.AG.2 (Arroz gigante replicada 2)			
JP.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	PE.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)	SA.AG.3 (Arroz gigante replicada 3)			

Antes de iniciar as reações de fermentação, amostras dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante foram retiradas para quantificação de glicose por

meio de CLAE. Quando se obtinha uma concentração superior a 120 g/L de glicose, os hidrolisados eram diluídos a essa concentração, com a solução tampão citrato de sódio 0,1 M. Isso porque o inóculo foi feito utilizando-se 20% de leveduras em relação à quantidade de açúcares. Além disso, o volume de hidrolisado em cada erlenmeyer correspondia a 140 mL. A determinação da viabilidade celular também era realizada antes de iniciar as reações de fermentação, para que pudesse determinar de fato a quantidade de levedura necessária no inóculo.

Ajustou-se os parâmetros do shaker para a temperatura de 32 °C, agitação de 150 rpm. As fermentações transcorreram por 72 horas, sendo que alíquotas foram retiradas com tempos de fermentação de: 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 28 h, 32 h, 48 h, 52 h, 56 h e 72 h. As amostras retiradas foram centrifugadas e congeladas para posterior quantificação dos produtos de fermentação por CLAE.



**Figura 11.** Sistema utilizado para as reações de fermentação com as diferentes linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **4.2.7.2. Reações de Fermentação Conduzidas no Sistema de Fermentação**

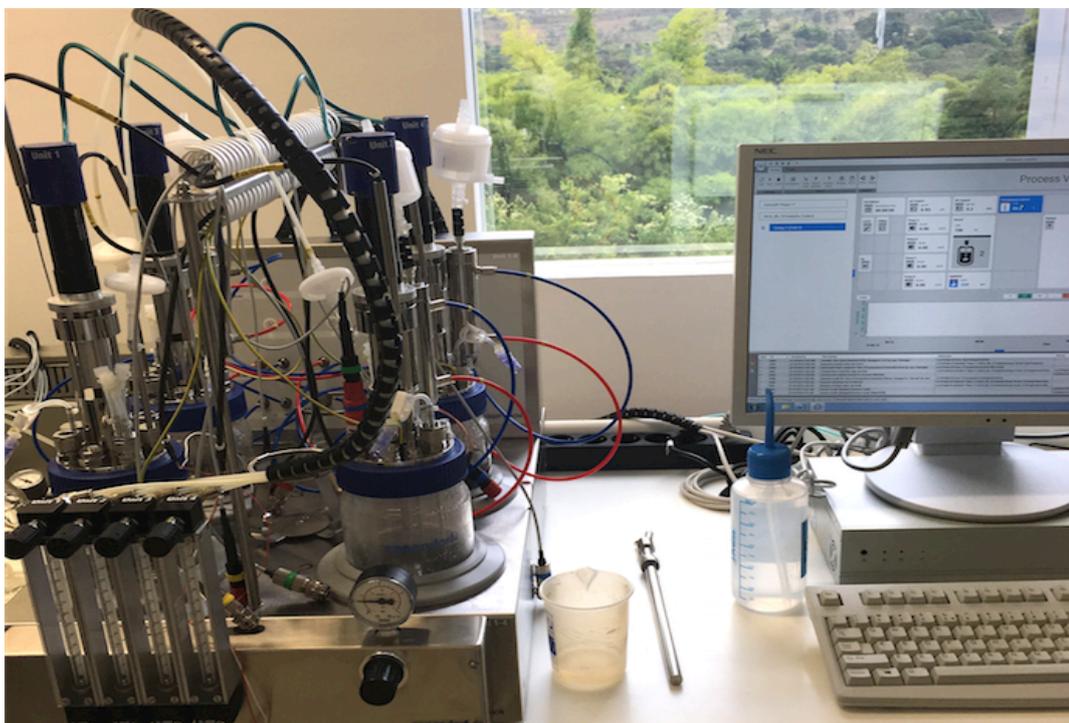
As reações de fermentação foram realizadas com os hidrolisados centrifugados e não centrifugados do arroz comercial e arroz gigante, conduzidas no Sistema de Fermentação, modelo Dasgip Bioblock, sob controle de temperatura, agitação e pH. Antes de dar início as fermentações, determinou-se a viabilidade celular do meio de cultura com a levedura CAT-1, bem como amostras dos hidrolisados de ambos os arrozes foram retiradas para quantificação de glicose por meio de CLAE. Quando obtinha-se uma concentração de glicose superior a 120 g/L, os hidrolisados eram diluídos a essa concentração, com a solução tampão citrato de sódio 0,1 M. O volume de hidrolisado utilizado para cada reação de fermentação era de 300 mL. O inóculo foi feito utilizando-se 15% de leveduras em relação à quantidade de açúcares.

Para que fosse possível obter o volume (mL) de levedura necessária para fermentação, realizou-se leitura da densidade ótica (DO) no Espectrofotômetro Spectramax Molecular Devices, da marca Tecnal, em triplicata. Para isso, homogeneizou-se o meio líquido YPG 10% com a levedura, retirou-se uma alíquota e a mesma foi diluída 32 vezes. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 600 nm para obtenção da densidade ótica. Após as três leituras, o valor da média da absorbância foi substituído na equação referente a curva padrão obtida após determinação do peso seco de cada linhagem da levedura, fornecendo o valor da concentração celular (g/L).

Levando-se em consideração a viabilidade celular e, com o valor da concentração celular (g/L) e da quantidade de levedura necessária em massa (g), obteve-se o volume (mL) do meio de cultura que deveria ser centrifugado para que as leveduras fossem então adicionadas ao frasco reator. Para a centrifugação do meio, utilizou-se a Centrífuga de Bancada Thermo Scientific, modelo Megafuge 40R, a 4700 rpm, por 5 minutos. As leveduras foram re-suspensas e adicionadas ao frasco biorreator. O sobrenadante foi descartado.

Ajustou-se os parâmetros do fermentador para uma temperatura de 32 °C e agitação de 150 rpm. As fermentações tiveram tempo de duração de 24 horas, sendo que alíquotas foram retiradas, para posterior quantificação dos produtos de

fermentação por CLAE, com tempo de fermentação de: 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h e 24 h.



**Figura 12.** Sistema de Fermentação Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock, utilizado para as fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante.

#### **4.2.8. CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO**

Após as reações de fermentação dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante, alguns parâmetros de fermentação foram calculados, como: fator de conversão de substrato em produto, rendimento, produtividade e velocidade de consumo de substrato.

##### **4.2.8.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto Etanol**

O fator de conversão de substrato em produto foi expresso em  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{glicose}}$ . O cálculo foi realizado conforme equação:

$$Y_{P/S} = - \frac{dP}{dS}$$

onde, P é a concentração do produto (g/L) e S é a concentração do substrato (g/L).

#### 4.2.8.2. Rendimento da Fermentação

A rendimento das fermentações dos hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante foram obtidos com base no rendimento teórico oriundo da equação de Gay-Lussac, onde  $51,1 \text{ g}_{\text{etanol}}/100\text{g}_{\text{glicose}}$ .<sup>28</sup> Dessa forma utilizou-se a equação:

$$R = (Y_{P/S} \cdot 100) / 0,511$$

#### 4.2.8.3. Produtividade

A produtividade do processo foi determinada pela concentração de etanol obtida em relação ao tempo da fermentação, e expressa em  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L}\cdot\text{h}$ .

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Etanol obtido}}{\text{Tempo da fermentação}}$$

#### 4.2.8.4. Velocidade de consumo de substrato

A velocidade de consumo de substrato foi determinada pela quantidade de glicose consumida ( $\text{g}/\text{L}$ ) com relação ao tempo de fermentação ( $\text{h}$ ).

$$V = \frac{dS}{dT}$$

onde, S é a concentração do substrato ( $\text{g}/\text{L}$ ) e T é o tempo transcorrido de fermentação.

#### 4.2.9. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A quantificação da glicose obtida após reações de hidrólise enzimática, bem como a quantificação dos produtos da fermentação, foram feitas por meio de análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), realizadas no equipamento Infinity 1260 Agilent Technology, com coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (BioRad), temperatura da coluna a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , detector índice de refração (RID), temperatura da cela do detector a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . A fase móvel para essa coluna cromatográfica corresponde uma solução de ácido sulfúrico  $0,005 \text{ M}$ , com vazão de

0,600 mL/min. O tempo de retenção aproximado para a Glicose é de 9 minutos, para o Glicerol é de 13,4 minutos e para o etanol é de 21,6 minutos.

O método de determinação de açúcares, etanol e subprodutos de fermentação, como o glicerol por CLAE consiste em um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases, a fase estacionária, correspondente a coluna cromatográfica, e a fase móvel. A fase móvel passa, então pela fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura. A diferença da interação dos analitos com a fase móvel e a fase estacionária possibilita a separação dos compostos.

O equipamento foi utilizado conforme instruções fornecidas pelo fabricante, sendo necessária a construção de uma curva padrão com os compostos de interesse. Dessa forma, preparou-se uma solução padrão com concentração de 5 g/L, pesou-se 0,1250 g de glicose, glicerol e etanol, sendo que todos os reagentes utilizados eram de alta pureza. Solubilizou-se em água Milli-Q e a solução foi avolumada para 25 mL. A partir dessa solução padrão 5 g/L, realizou-se 6 diluições. Separou-se 5 tubos de ensaio, com 1 mL de água Milli-Q em cada tubo. Ao primeiro tubo, adicionou-se 1 mL da solução padrão 5 g/L. Homogeneizou-se em agitador para tubos de ensaio Vortex. Transferiu-se 1 mL da diluição para o próximo tubo e assim sucessivamente, até completar as diluições em série. Cada uma das soluções foi transferida para vials devidamente identificados. Assim, os 6 pontos da curva padrão possuíam concentrações de: 0,15625 g/L; 0,3125 g/L; 0,625 g/L; 1,25 g/L; 2,5 g/L; 5,0 g/L.

As amostras a serem analisadas também foram diluídas de forma que a concentração estivesse dentro dos valores da curva padrão. Após análise das amostras por CLAE, as concentrações obtidas para cada composto eram multiplicadas pelo fator de diluição.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As reações de hidrólise enzimática para otimização do processo foram conduzidas no sistema de fermentação, adotando os valores de temperatura e pH ótimos para cada enzima conforme especificações do fabricante. Analisou-se a ausência e a presença da enzima Termamyl 2X, em diferentes tempos, durante a etapa de liquefação do amido. Além disso, a ação da amiloglucosidase AMG 300 L durante a etapa de sacarificação também foi estudada, em diferentes tempos de reação. Alíquotas foram retiradas e analisadas por CLAE para quantificação da glicose. Dessa forma, foram realizados 3 blocos de hidrólises que possibilitaram a avaliação de 15 combinações do conjunto Termamyl 2X e AMG 300 L descritas conforme Tabela 5.

**Tabela 5.** Reações enzimática realizadas para otimização do tempo no processo de hidrólise do amido presente no arroz.

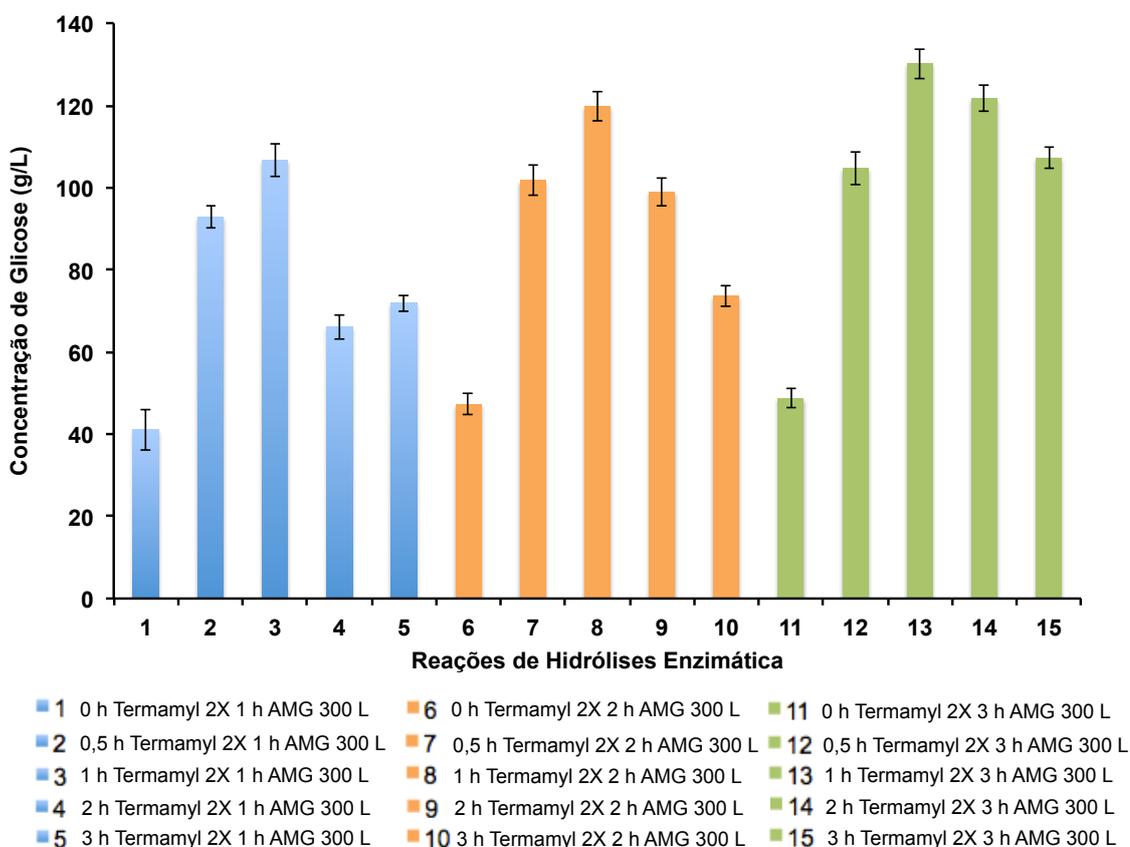
Hidrólise	Termamyl 2X	AMG 300 L	Hidrólise	Termamyl 2X	AMG 300 L	Hidrólise	Termamyl 2X	AMG 300 L
1	-	1 h	6	-	2 h	11	-	3 h
2	0,5 h	1 h	7	0,5 h	2 h	12	0,5 h	3 h
3	1 h	1 h	8	1 h	2 h	13	1 h	3 h
4	2 h	1 h	9	2 h	2 h	14	2 h	3 h
5	3 h	1 h	10	3 h	2 h	15	3 h	3 h

As amostras obtidas foram analisadas pelo CLAE, os resultados gerados foram plotados num gráfico de barras referente a concentração (g/L) de glicose gerada para as reações de hidrólise em função dos tempos.

Os resultados apresentados na Figura 13, mostram que independente do tempo de ação da Termamyl 2X, após 3 h de reação da AMG 300 L, maior a concentração final de glicose. Além disso, percebe-se que a reação de 1 h de ação da Termamyl 2X e 3 h de ação da AMG 300 L (Hidrólise 13) apresentou maior concentração final de glicose, sendo essa a melhor condição de reação.

Analisando o comportamento da Termamyl 2X, percebe-se que ao não se utilizar essa enzima na etapa de liquefação do amido (Hidrólises 1, 6 e 11), a enzima AMG 300 L não atua de forma eficiente na sacarificação e obtenção de glicose.

Como as ligações internas da amilose e da amilopectina não foram quebradas à dextrinas, a amiloglucosidase não conseguiu romper as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6-glicosídicas na etapa de sacarificação, levando a uma menor concentração final de glicose. Além disso, com base no gráfico de barras, percebe-se que a menor concentração de glicose foi obtida para a hidrólise 1, que a enzima AMG 300 L atuou por 1h. Nas hidrólises representadas pelas barras 6 e 11, nas quais a AMG 300L possuiu tempo de ação de 2 h e 3 h respectivamente, a concentração de glicose final foi similar, aproximadamente 48 g/L.



**Figura 13.** Concentrações de glicose durante as reações de hidrólise enzimática do amido presente no arroz comercial.

Para as reações com 30 min de ação da Termamyl 2X (Hidrólises 2, 7 e 12), a menor concentração de glicose foi obtida para a hidrólise 2, a qual a enzima AMG 300 L atuou por 1h. Nas hidrólises 7 e 12, nas quais a AMG 300L possuiu tempo de ação de 2 h e 3 h respectivamente, a concentração de glicose final foi similar, aproximadamente 103 g/L. Com base nos resultados apresentados, percebe-se que com 30 minutos de ação da Termamyl 2X, já foi possível ocorrer o rompimento de

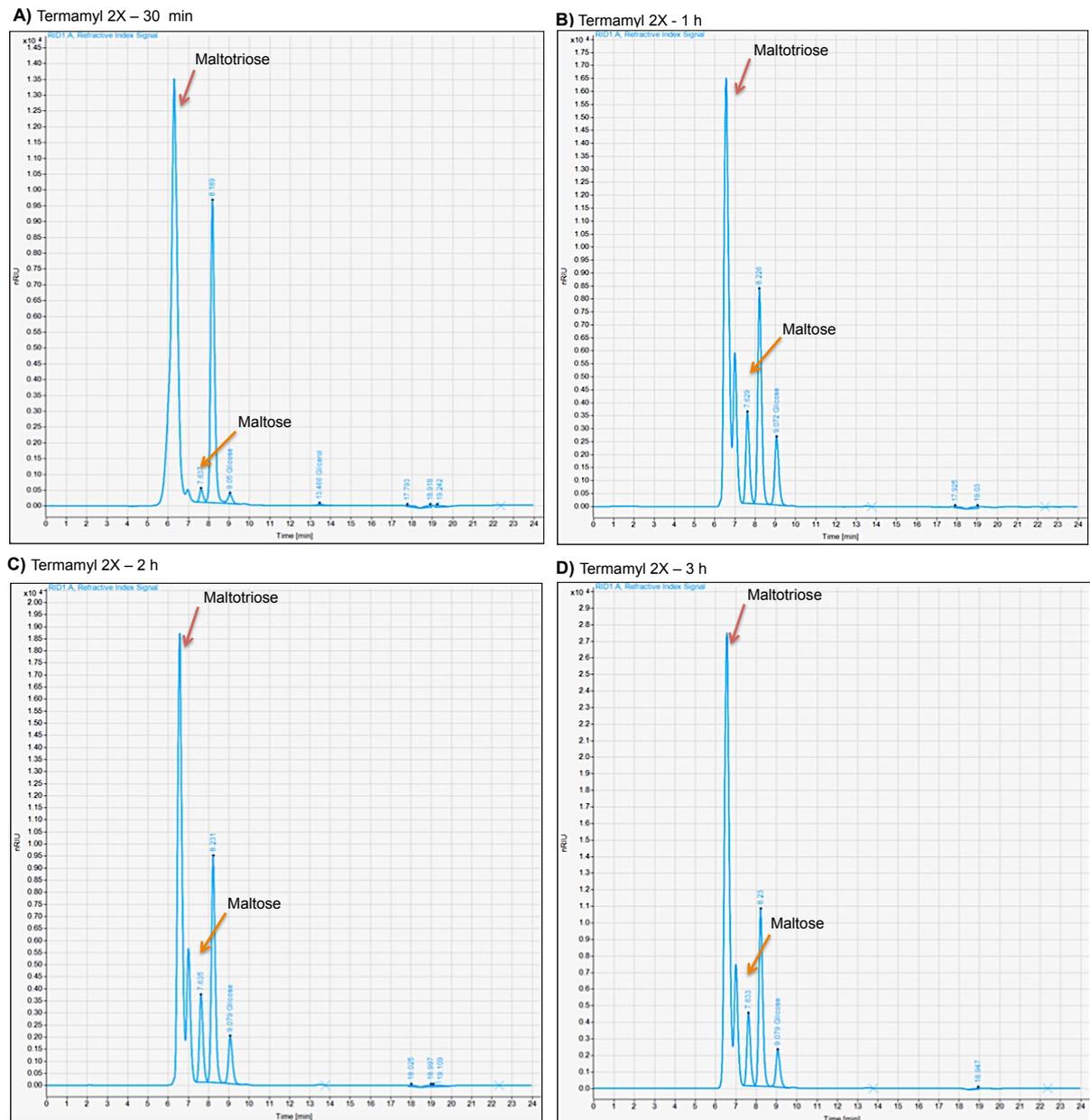
algumas ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, levando a uma maior concentração final de glicose comparadas ao resultados obtidos sem a ação dessa enzima. Porém, a concentração de glicose foi menor em comparação as demais reações. Com base nesta avaliação, pode-se sugerir que nem todas as ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas haviam sido clivadas.

As reações com 1h de ação da Termamyl 2X (Hidrólises 3, 8 e 13), foram as que levaram a maior concentração final de glicose. Na hidrólise 3, na qual a enzima AMG 300 L atuou por 1 h, a concentração final de glicose foi de 107 g/L. Nas hidrólises 8, na qual a AMG 300L atuou por 2 h, a concentração de glicose final foi aproximadamente 120 g/L. A concentração final de glicose na Hidrolise 13, com 3 h de ação da AMG 300 L, foi de aproximadamente 130 g/L, obtendo-se o ponto de maior rendimento dentre todos os pontos avaliados. Comprovando que fixando-se o tempo de reação da  $\alpha$ -amilase para 1h, quanto maior o tempo de reação da amiloglicosidase na etapa de sacarificação, maior a concentração final de glicose.

As concentrações finais de glicose obtidas nas reações conduzidas com 2 h de ação da enzima Termamyl 2X (Hidrólises 4, 9 e 14) e 3 h (Hidrólises 5, 10 e 15) de ação da Termamyl 2X, foram muito inferiores as conversões encontradas para a reação com 1 h de ação da Termamyl 2X. Dessa forma, observa-se que tempos de reação longos para etapa de liquefação (atuação da Termamyl 2X) não propicia maiores rendimentos da conversão de glicose. Para verificar tal comportamento, analisou-se os cromatogramas obtidos por CLAE, para as amostras referentes a ação da Termamyl 2x com 30 min, 1 h, 2 h e 3 h.

Análise dos cromatogramas obtidos para as amostras retiradas após ação da enzima Termamyl 2X nos respectivos tempos reacionais, Figura 14, mostram uma mudança no comportamento nos picos com tempo de retenção de aproximadamente 6,5 minutos e 7,6 minutos. Com 1 h de Termamyl 2X, percebe-se um aumento no pico com tempo de retenção 7,6 min e uma divisão ou suposta sobreposição no pico com tempo de retenção 6 min, em comparação ao cromatograma referente a ação da Termamyl 2X por 30 min. Nas reações com a Termamyl 2X atuando por 2 h e 3 h, ocorre um aumento significativo nesses picos. Com base nas informações fornecidas pela Aminex HPLC Clolumns, para a coluna HPX87H, os compostos que são identificados nesses respectivos tempos de retenção podem ser a maltotriose (três moléculas de glicose) e a maltose (duas moléculas de glicose).<sup>55</sup> Dessa forma,

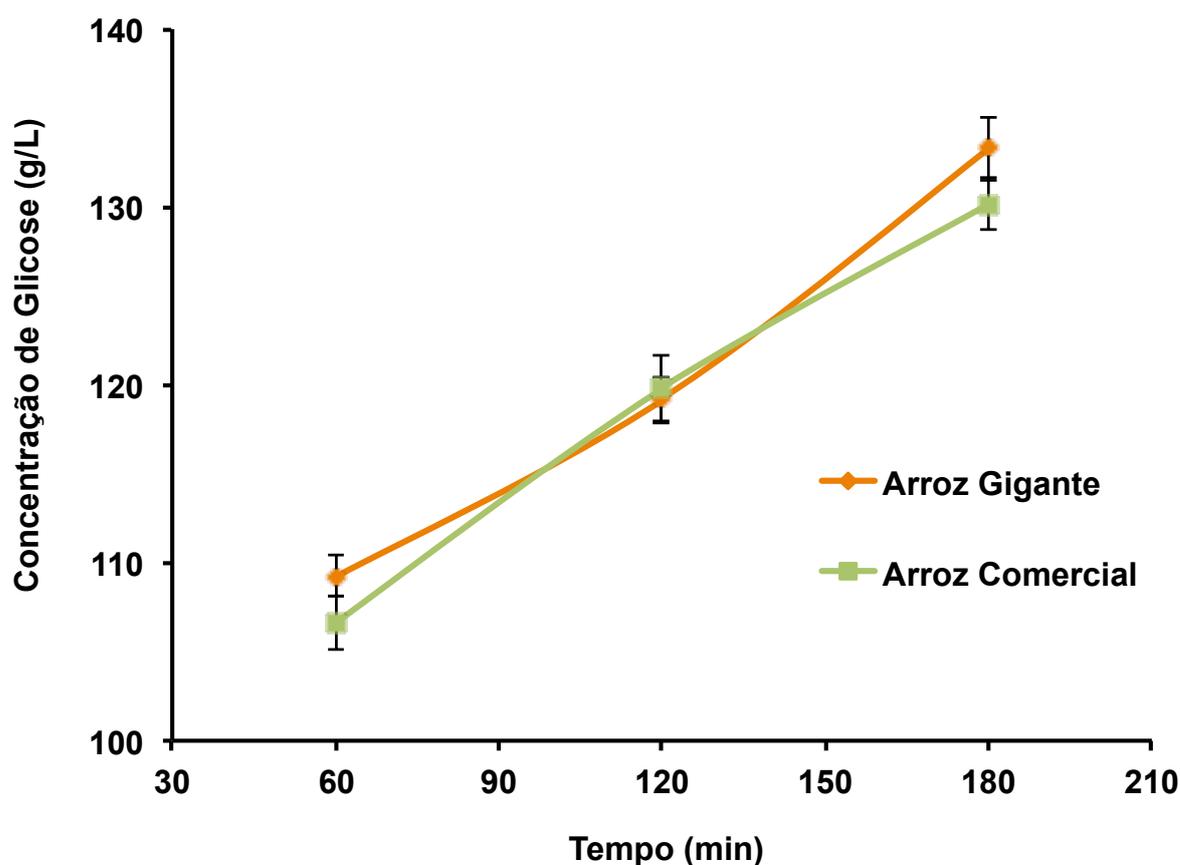
sugere-se que com o aumento do tempo de ação da Termamyl 2X, aumenta possivelmente a formação da maltotriose e da maltose. Com 3 h de reação da Termamyl, possivelmente houve maior formação de maltotriose, que possivelmente dificulta a ação da AMG 300 L durante a sacarificação. Isso porque a maltotriose e a maltose são hidrolisadas a uma taxa mais baixa em comparação as cadeias maiores de oligossacarídeos.<sup>45, 46</sup>



**Figura 14.** Cromatogramas referentes as amostras das reações de hidrólise, com: A) 30 min de ação da Termamyl 2x; B) 1h de ação da Termamyl 2X; C) 2 h de ação da Termamyl 2X e D) 3 h de ação da Termamyl 2X.

### 5.1.1. Hidrólise Enzimática do Arroz Comercial e Arroz Gigante nas Condições Determinadas

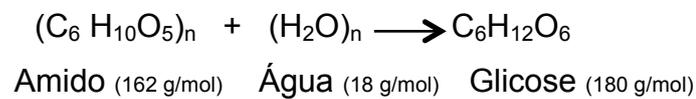
Após análise dos resultados obtidos nos estudos de otimização do tempo de hidrólise, a melhor conversão do amido em glicose foi obtida para a hidrólises onde a enzima  $\alpha$ -amilase atuou por 1h a 90 °C, pH 5,5 na etapa de liquefação, seguida da sacarificação com a amiloglucosidase atuando por 3 h a 60 °C, pH 4,5. Dessa forma, realizou-se uma reação de hidrólise enzimática nessas mesmas condições para o arroz gigante, a fim de se obter a porcentagem de amido presente para este tipo de arroz. Alíquotas foram retiradas a cada uma hora de reação e analisadas por CLAE. Os resultados para a hidrólise com arroz gigante e os resultados obtidos anteriormente para hidrólise do arroz comercial estão apresentados na Figura 15.



**Figura 15.** Perfis de concentração de glicose durante a etapa de sacarificação, para as hidrólises com arroz comercial e arroz gigante.

O comportamento das curvas apresentadas na Figura 15 para os perfis de concentração de glicose demonstra que ao final das reações de hidrólise, os arroz comercial e arroz gigante produzem aproximadamente a mesma concentração de glicose.

Com base na equação estequiométrica abaixo, que representa a conversão do amido à glicose, na qual a massa molar do amido é de 162 g/mol, o peso molecular da água é 18 g/mol e o peso molecular da glicose é de 180 g/mol, determinou-se a quantidade de amido presente em cada arroz.



Para a quantificação do amido, levou-se em consideração a massa de arroz utilizada (45 g), o volume de solução tampão (0,3 L) e as concentrações finais de glicose obtidas após hidrólises enzimáticas. De acordo com o balanço de massa e a equação estequiométrica, determinou-se que 78% da composição do arroz comercial, e 80 % da composição do arroz gigante correspondem a amido.

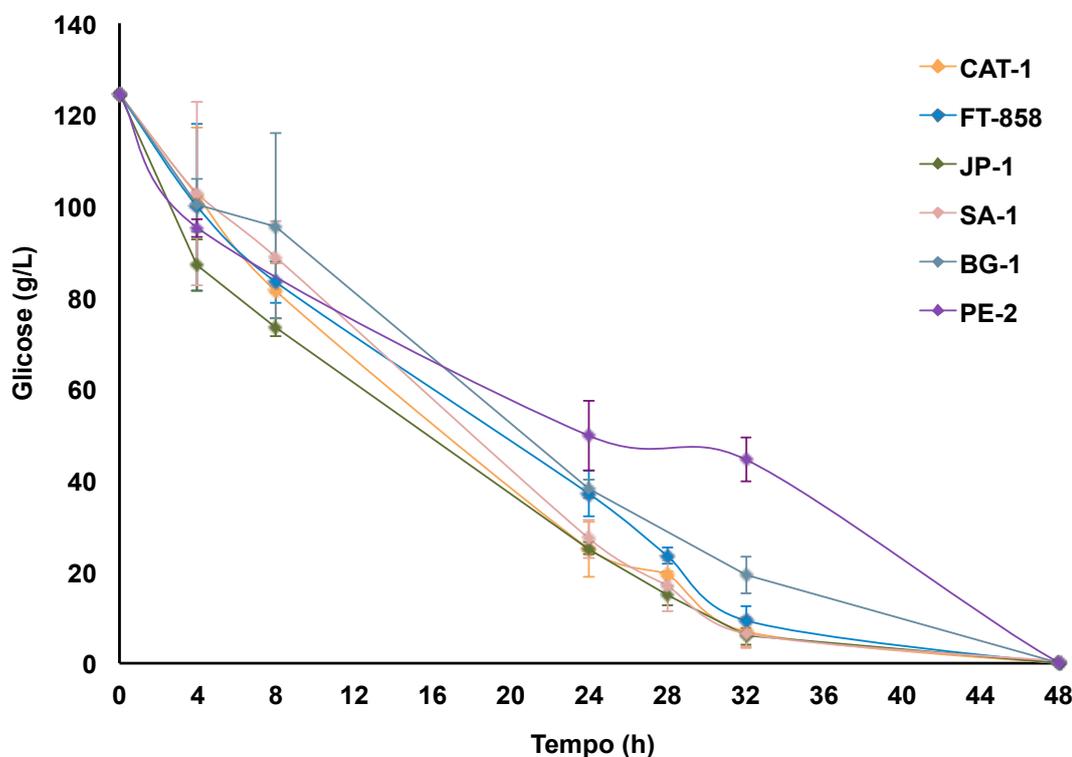
Estudos apontam que amostras de arroz apresentam aproximadamente 80% de amido em sua composição.<sup>32</sup> Dessa forma, os valores obtidos de amido para o arroz comercial e para o arroz gigante estão em acordo com os valores encontrados na literatura. Além disso, as hidrólises realizadas nas condições de 1 h de reação com a Termamyl 2X a 90 °C e pH 5,5 e 3 h de reação com a AMG 300L a 60 °C e pH 4,5 para ambos os arrozes apresentaram uma concentração final de glicose similar, por volta de 130 g/L, mostrando que mesmo com morfologia de amido tão distintas, com base na relação amilose-amilopectina, os dois tipos de arroz apresentam concentração de amido e conseqüentemente de glicose semelhantes, após a etapa de sacarificação.

## 5.2. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS DE ARROZ COMERCIAL E ARROZ GIGANTE

As fermentações foram realizadas com as linhagens BG-1, CAT-1, FT-858, JP-1, PE-2, SA-1, pois tais linhagens são as mais utilizadas na produção de etanol em escala industrial. Então, com os hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante, em shaker orbital com temperatura regulada para 32 °C e frequência de agitação de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas com tempos de fermentação de: 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 28 h, 32 h, 48 h, 52 h, 56 h e 72 h e analisadas por CLAE.

### 5.2.1. Fermentação do Hidrolisado de Arroz Comercial com as Diferentes Linhagens de Leveduras da Espécie *Saccharomyces cerevisiae*

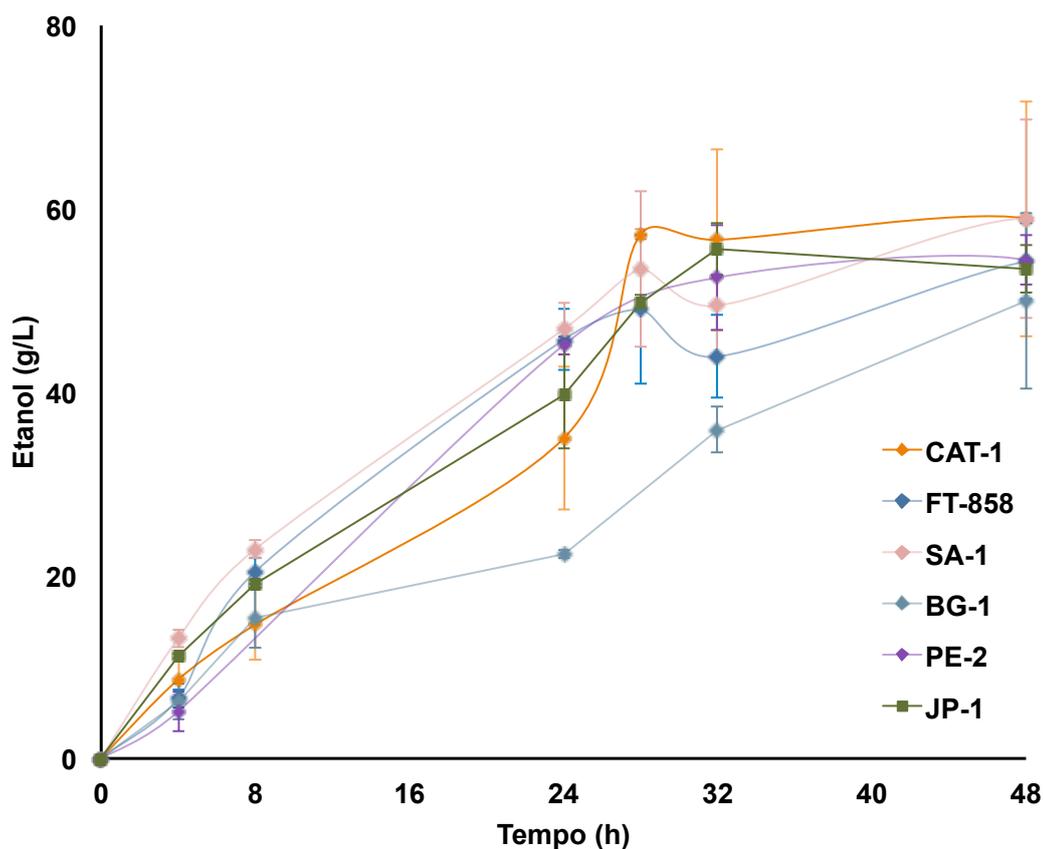
O consumo de glicose para as fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz comercial com as 6 linhagens da *S. cerevisiae* é apresentado na Figura 16. Vale ressaltar que apesar das fermentações terem transcorrido por 72 h, plotou-se o gráfico até 48 h, uma vez que o consumo por completo da glicose ocorria neste tempo de fermentação.



**Figura 16.** Perfis de concentração de glicose durante as fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz comercial.

Com base nos perfis de concentração de glicose, apresentados na Figura 16, percebe-se que a concentração inicial de glicose era a mesma para todas as linhagens, aproximadamente 124 g/L. A linhagem JP-1 apresentou cinética de reação mais rápida, uma vez que comparada as demais leveduras, possuía concentração de glicose menor com os mesmos tempos de reação. A PE-2 foi a levedura com cinética mais lenta, uma vez que após 32 h de fermentação a concentração de glicose era de aproximadamente 45 g/L enquanto as outras linhagens apresentavam concentração por volta de 20 g/L ou abaixo desse valor. Com 48 h de fermentação as leveduras CAT-1, BG-1, FT-858 já haviam consumido toda a glicose. As leveduras JP-1, PE-2 e SA-1 estavam com concentração de glicose próxima a zero, porém ainda não havia ocorrido o consumo total, restando glicose residual no meio fermentativo. A concentração de glicose com 48 h de fermentação era de 0,173 g/L para a levedura JP-1, 0,201 g/L para a PE-2 e 0,507 g/L para a SA-1.

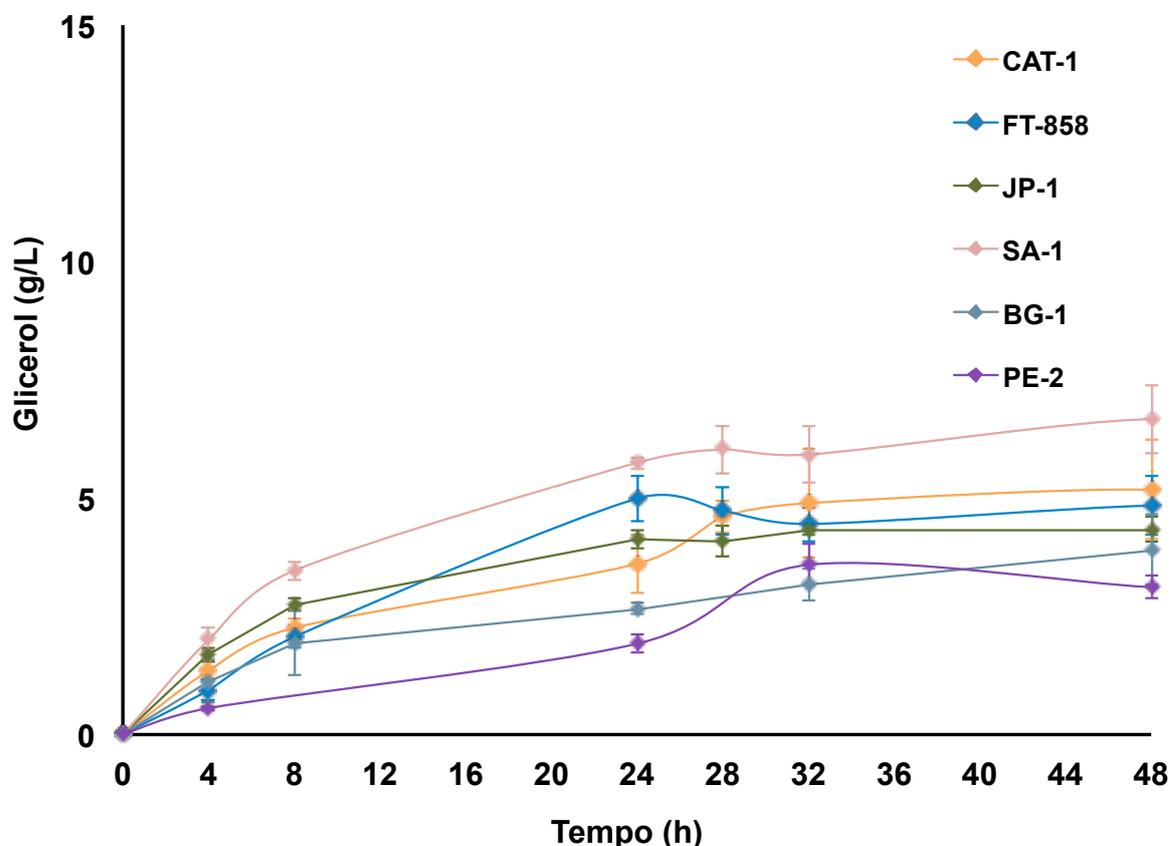
A Figura 17 apresenta os perfis de concentração de etanol para as fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz comercial com as 6 linhagens da *S. cerevisiae*.



**Figura 17.** Perfis de concentração da produção de etanol durante as fermentações com as 6 leveduras, no hidrolisado de arroz comercial.

Com base nos perfis de concentração de etanol, apresentados na Figura 17, percebe-se que com 4 h de fermentação a SA-1 produziu a maior quantidade de etanol, com concentração de 13 g/L. Em contrapartida, a PE-2 foi a que levou a menor concentração de etanol para o mesmo tempo de reação, aproximadamente 2 g/L. O perfil de concentração de etanol da BG-1 demonstra que essa levedura apresentou maior dificuldade na conversão da glicose em etanol, em comparação com as demais, uma vez que as concentrações obtidas foram as mais baixas. Após 48 h de fermentação, a concentração final de etanol para a BG-1 foi de aproximadamente 50 g/L. As leveduras que produziram uma maior quantidade de etanol foram CAT-1 e SA-1, com concentração final de 59 g/L. As leveduras FT-858 e PE-2 produziram aproximadamente 54 g/L de etanol após 48 h de fermentação. Já a levedura JP-1, produziu 53 g/L de etanol após 48 h de fermentação.

O glicerol foi um coproduto obtido em todas as fermentações, sendo que os perfis de concentração de glicerol estão apresentados na Figura 18.



**Figura 18.** Perfis de concentração de glicerol durante a fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz comercial.

Com base nas curvas apresentadas para a produção de glicerol no transcorrer das fermentações (Figura 18), percebe-se uma semelhança nos perfis de concentração desse coproduto. Entretanto, durante toda a fermentação a levedura SA-1 produziu maiores concentrações de glicerol, demonstrando que a levedura encontrava-se em condições de maior estresse em comparação as demais.

As condições do meio reacional são determinantes para o metabolismo celular das leveduras. Condições estressantes para a levedura proporcionam um menor rendimento e maior formação deste coproduto. Maiores quantidades de glicerol são obtidas quando a levedura encontra-se em estresse osmótico, uma vez que nessa condição, a levedura perde água e inicia a síntese de glicerol para resguardar as células da desidratação e protegê-las dos efeitos oriundos da condição de estresse.<sup>56</sup> Além do estresse osmótico, a concentração do substrato, o

pH e a temperatura do meio fermentativo, a taxa de agitação, a presença de contaminantes e o tempo de fermentação são fatores os quais podem ocasionar o estresse da levedura, conseqüentemente, uma maior formação de coprodutos.<sup>16, 47</sup>

Ao final de 48 h de fermentação, a concentração de glicerol para a levedura SA-1 foi de 6,7 g/L. A levedura que produziu a segunda maior concentração de glicerol foi a CAT-1, com aproximadamente 5 g/L. Em contrapartida, a levedura PE-2 foi a que produziu menores quantidade de glicerol. Após 48 h a concentração de glicerol foi de 3 g/L para essa levedura. As leveduras FT-858, JP-1, BG-1 produziram, 4,8 g/L, 4,3 g/L e 3,9 g/L, respectivamente.

Após analisar os perfis de concentração para o consumo de glicose, produção de etanol e glicerol, calculou-se o rendimento das fermentações, os fatores de conversão de glicose em etanol ( $Y_{E/S}$ ), fatores de conversão de glicose em glicerol ( $Y_{G/S}$ ), produtividades e velocidades de consumo do substrato. Os resultados obtidos estão apresentados a Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros das Fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz comercial com as diferentes linhagens da *Saccharomyces cerevisiae*, após 48 h de fermentação.

	BG-1	CAT-1	FT-858	JP-1	PE-2	SA-1
Etanol obtido (g/L)	49,96	58,93	54,22	53,43	54,40	58,92
Glicerol obtido (g/L)	3,91	5,17	4,84	4,33	3,12	6,67
Rendimento (%)	78,6	92,7	85,3	84,1	85,7	93,0
$Y_{E/S}$	0,401	0,474	0,436	0,430	0,438	0,475
$Y_{G/S}$	0,031	0,042	0,039	0,035	0,025	0,054
Produtividade (g etanol/L.h)	1,04	1,23	1,13	1,11	1,13	1,23
Vel. consumo substrato (g glicose/L.h)	2,59	2,59	2,59	2,59	2,59	2,58
Glicose residual (g/L)	0,000	0,000	0,000	0,173	0,201	0,507

Com base nos parâmetros obtidos para as fermentações com as 6 diferentes linhagens da *S. cerevisiae* apresentados na Tabela 7, a levedura que apresentou maior rendimento foi a SA-1, com 93 %, e concentração final de etanol de 58,92 g/L. Entretanto, após 48 h de fermentação, o substrato não havia sido totalmente consumido, restando uma concentração residual de glicose de 0,507 g/L. A CAT-1 apresentou o segundo maior rendimento, 92,7%, com consumo total da glicose e concentração final de etanol de 58,93 g/L. Com base nas curvas de produção de etanol para as fermentações realizadas com essas duas leveduras, apresentadas na Figura 17, percebe-se que estatisticamente a concentração final de etanol foi a mesma, uma vez que o erro obtido pelo desvio padrão das amostras analisadas com 48 h de fermentação foi elevado e estão sobrepostos. Além disso, a produtividade foi a equivalente para as duas leveduras,  $1,23 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L}\cdot\text{h}$ , porém a concentração de glicerol foi menor para a CAT-1, 5,17 g/L e 6,67 g/L para a SA-1. Dessa forma, apesar do rendimento da linhagem SA-1 ter sido um pouco maior, a levedura não consumiu toda a glicose e formou mais coproduto de fermentação que a CAT-1.

As leveduras FT-858 e PE-2 apresentaram parâmetros de fermentação similar. O rendimento da PE-2 foi de 85,7% e concentração final de etanol de 54,40 g/L. O rendimento da FT-858 foi de 85,3% e concentração final de etanol de 54,22 g/L. Apesar da concentração final de glicerol ter sido maior para a FT-858, 4,84 g/L contra 3,12 g/L da PE-2, o consumo total do substrato ocorreu apenas para a FT-858. Ao final das 48 h de fermentação a PE-2 possuiu glicose residual no meio fermentativo com concentração de 0,201 g/L. A produtividade do processo e a velocidade de consumo do substrato foi a mesma para as duas leveduras,  $1,12 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L}\cdot\text{h}$  e  $2,59 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{L}\cdot\text{h}$ , respectivamente.

A levedura JP-1 teve um rendimento de fermentação de 84,1%. A concentração final de etanol foi de 53,43 g/L e concentração final de glicerol de 4,33 g/L. Assim como a PE-2 e a SA-1, a levedura não conseguiu consumir todo o substrato, de forma que o meio fermentativo possuía uma concentração de glicose residual de 0,173 g/L.

A fermentação realizada com a levedura BG-1 foi a que apresentou menor rendimento, 78,6%, apesar de ter consumido toda a glicose e não ter formado concentrações elevadas de glicerol, 3,91 g/L. Conforme apresentado anteriormente

na Figura 16, durante toda a fermentação essa levedura produziu concentrações menores de etanol em comparação as demais linhagens, obtendo-se o menor valor de produtividade  $1,04 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L}\cdot\text{h}$ , com base nestes resultados podemos sugerir que esta levedura consome parte da glicose para crescimento celular.

As fermentações realizadas com os hidrolisados de arroz comercial apresentaram maior rendimento e maior concentração final de etanol ao se utilizar as cepas de *S. cerevisiae* CAT-1 e SA-1. Entretanto, a SA-1 não consumiu todo o substrato e levou a maior concentração obtida de glicerol. O rendimento elevado ao se utilizar a levedura CAT-1 também é observado nas fermentações realizadas em escala industrial.<sup>47</sup>

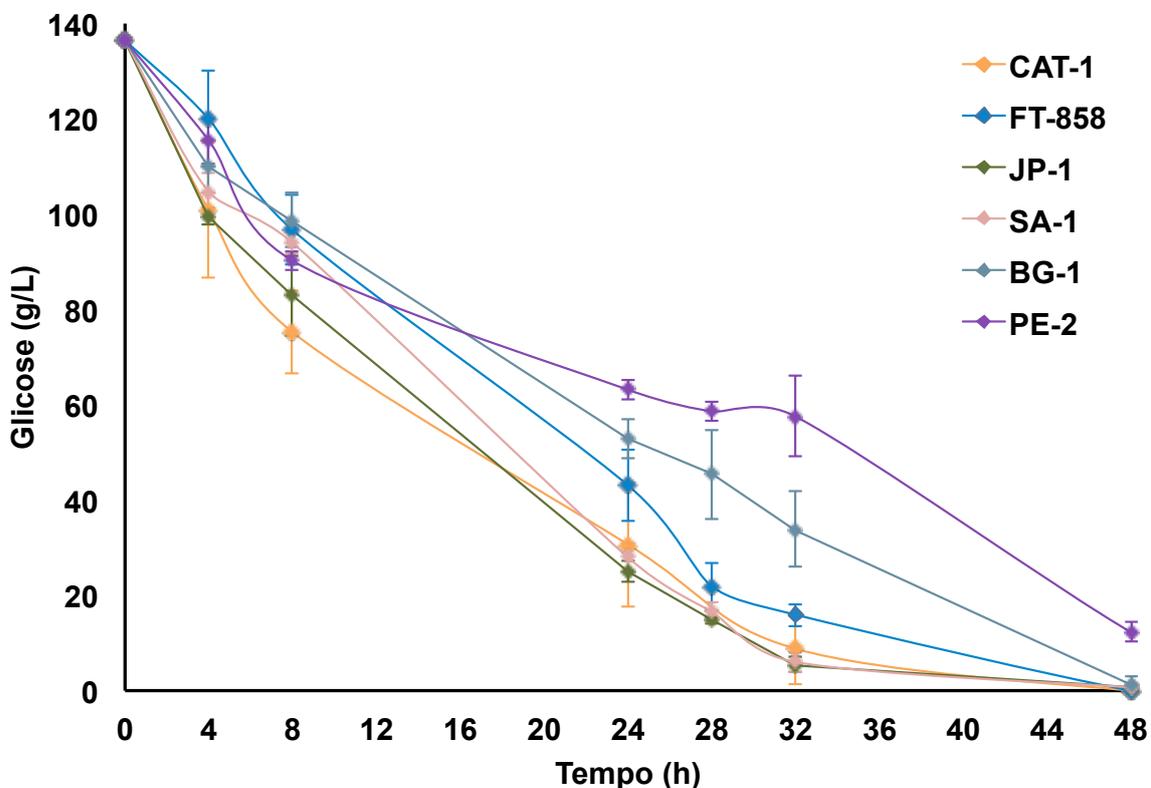
Cada linhagem comercial da *S. cerevisiae* apresenta características específicas que são levadas em consideração na escolha para o processo fermentativo. No Brasil, as leveduras mais utilizadas nas fermentações para obtenção de etanol são a CAT-1 e a PE-1. Isso por que essas leveduras estão mais adaptadas às condições industriais, e proporcionam maior rendimento de etanol e menor quantidade de açúcar residual. Além disso, produzem pouca espuma durante a fermentação e não floculam.<sup>57</sup> Como a principal matéria prima utilizada nas indústrias sucroalcooleiras brasileiras é a cana-de-açúcar, a levedura deve-se mostrar resistente a presença de metais no mosto. Dessa forma, a CAT-1 mostra-se tolerante ao alumínio presente no mosto de caldo de cana-de-açúcar. A PE-2 por sua vez, apresenta tolerância a teores alcoólicos de até 15% (v/v).<sup>58</sup>

As leveduras FT-858 e BG-1 apresentam como principal característica a resistência a pH baixos, além formarem pouca espuma durante a fermentação.<sup>59, 60</sup> A SA-1 também apresenta resistência a pH baixos. Além disso, assim como a PE-2, essa linhagem é tolerante a teores alcoólicos de até 15% (v/v).<sup>61</sup> A JP-1 por sua vez, apresenta como principal vantagem a tolerância a altas temperaturas, e não floculam.<sup>62</sup>

### **5.2.2. Fermentação do Hidrolisado de Arroz Gigante com as Diferentes Linhagens de Leveduras da Espécie *Saccharomyces cerevisiae***

O consumo de glicose para as fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz gigante com as 6 linhagens da *S. cerevisiae* é apresentado na Figura 19.

Apesar das fermentações terem transcorrido por 72 h, plotou-se o gráfico até 48 h, uma vez que consumo total de glicose estava estabelecido em 48 h para a maioria das cepas utilizadas.



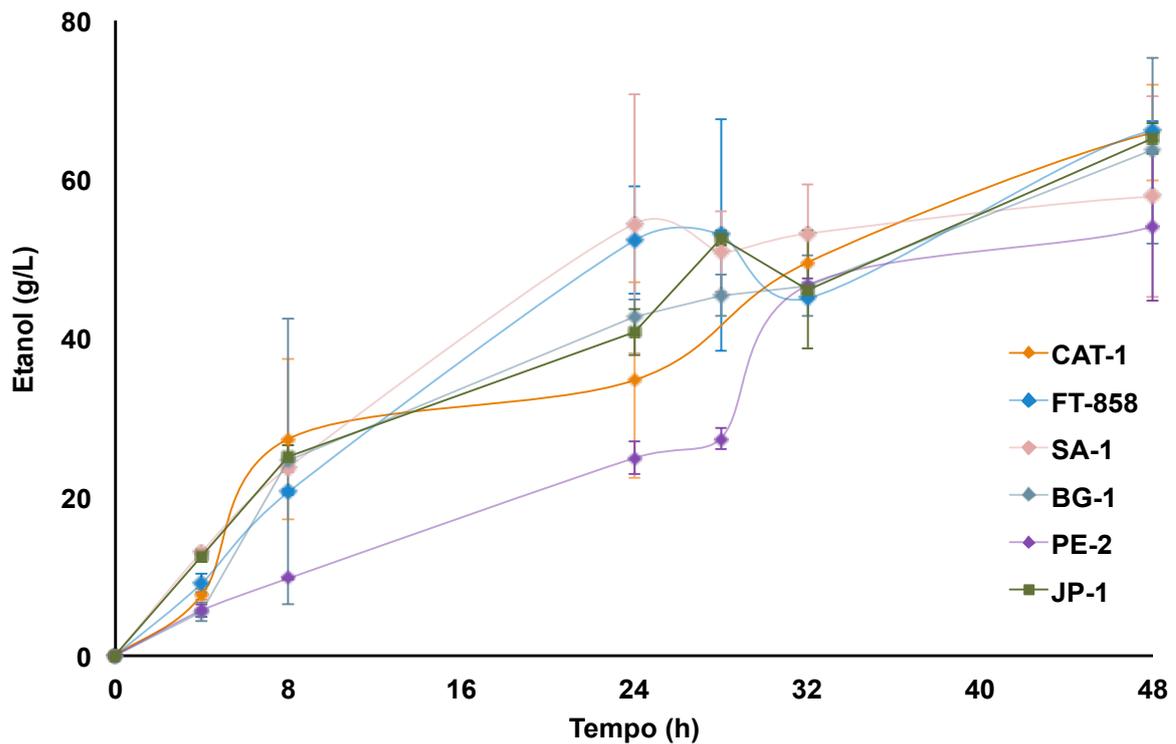
**Figura 19.** Perfis de concentração de glicose durante as fermentações com as 6 leveduras, com o hidrolisado de arroz gigante.

Com base nos perfis de concentração de glicose, apresentados na Figura 19, percebe-se que a concentração inicial de glicose era a mesma para todas as linhagens, 136,5 g/L, uma vez que o hidrolisado de arroz gigante era o mesmo para todas as fermentações. As linhagens CAT-1, JP-1 e SA-1 apresentaram cinética de reação mais rápida, uma vez que comparada as demais leveduras, possuíam concentração de glicose menor com os mesmos tempos de reação. A PE-2 foi a levedura com cinética mais lenta e com menor consumo da glicose, uma vez que após 48 h de fermentação a concentração de glicose no meio fermentativo era de aproximadamente 12,3 g/L. A cepa BG-1 também apresentou cinética mais lenta de reação, e transcorrido o tempo de 48 h de fermentação o meio ainda continha glicose, com concentração de 1,03 g/L. Com 48 h de fermentação as leveduras CAT-1 e FT-858 já haviam consumido toda a glicose. As leveduras JP-1 e SA-1

estavam com concentração de glicose próxima a zero, porém ainda não havia ocorrido o consumo total, restando glicose residual no meio fermentativo. A concentração de glicose com 48 h de fermentação era de 0,560 g/L para a levedura JP-1, 0,720 g/L para a SA-1.

A Figura 20 apresenta os perfis de concentração de etanol para as fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz gigante com as 6 linhagens da *S. cerevisiae*.

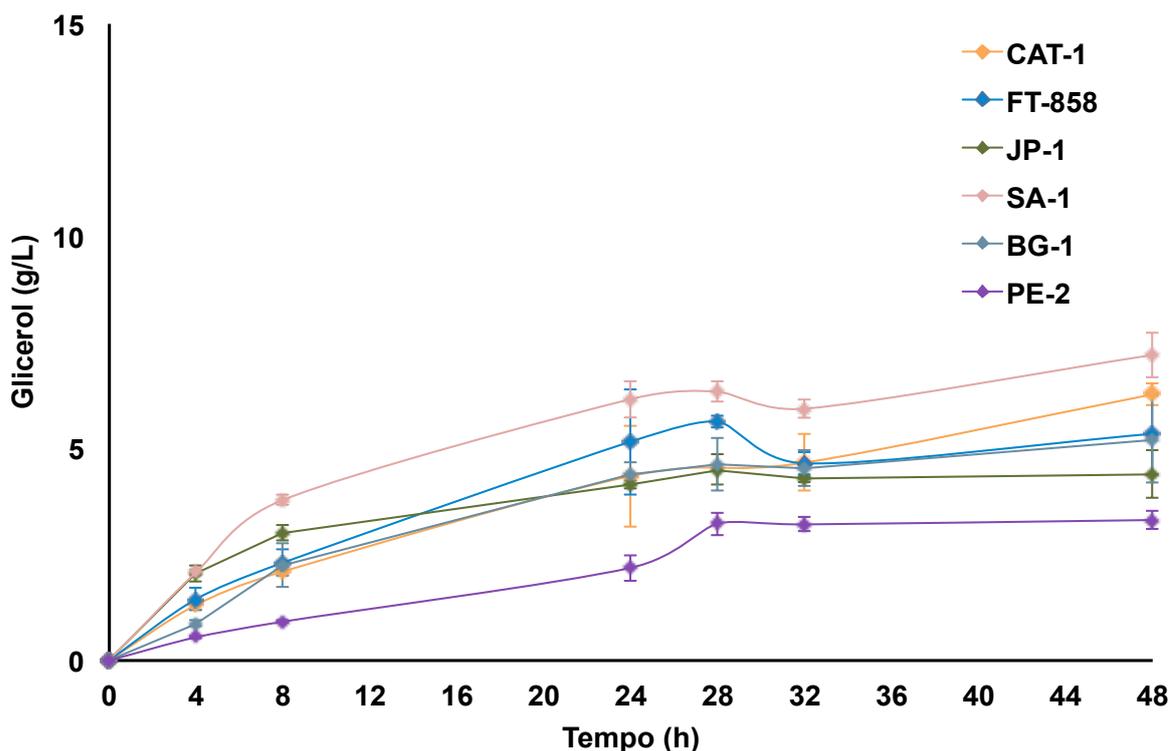
Com base nos perfis de concentração de etanol, apresentados na Figura 20, percebe-se que com 4 h de fermentação as leveduras JP-1 e SA-1 produziram as maiores quantidades de etanol, com concentração de 12,6 g/L e 13,1 g/L, respectivamente. Por outro lado, a BG-1 e a PE-2 foram as que possuíram a menor concentração de etanol para o mesmo tempo de reação, aproximadamente 5,5 g/L e 5,7 g/L, respectivamente. O perfil de concentração de etanol da PE-2 demonstra que essa levedura apresentou maior dificuldade na conversão da glicose em etanol, em comparação com as demais, uma vez que as concentrações obtidas foram as mais baixas, além de não ter ocorrido o consumo total da glicose. Após 48 h de fermentação, a concentração final de etanol para a PE-2 foi de aproximadamente 54,10 g/L. As leveduras que produziram uma maior quantidade de etanol foram FT-858 com concentração de 63,13 g/L e CAT-1, com concentração de 65,85 g/L. A levedura JP-1, produziu 65,16 g/L de etanol, após 48 h de fermentação. A concentração final de etanol para a levedura BG-1 foi de 63,61 g/L, e para a levedura SA-1 57,80 g/L.



**Figura 20.** Perfis de concentração de etanol durante as fermentações com as 6 leveduras, com o hidrolisado de arroz gigante.

O glicerol foi um coproduto obtido em todas as fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz gigante, sendo que os perfis de concentração de glicerol estão apresentados na Figura 21.

Com base nas curvas apresentadas para a produção de glicerol no transcorrer das fermentações (Figura 21), percebe-se uma semelhança nos perfis de concentração desse coproduto. Entretanto, assim como para as fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz comercial, durante toda a fermentação a levedura SA-1 produziu maiores concentrações de glicerol, demonstrando que a levedura encontrava-se em condições de maior estresse em comparação as demais. Essa condição pode estar relacionada a uma elevada pressão osmótica do meio fermentativo, bem como a condições adversas como pH ácido, temperatura elevada, concentração alta do substrato e até mesmo presença de contaminantes no meio. Tais fatores corroboram para a formação de coprodutos de fermentação.<sup>6, 33</sup>



**Figura 21.** Perfis de concentração de glicerol durante a fermentações com as 6 leveduras, com hidrolisado de arroz gigante.

Ao final de 48 h de fermentação, a concentração de glicerol para a levedura SA-1 foi de 7,20 g/L. A levedura que produziu a segunda maior concentração de glicerol foi a CAT-1, com aproximadamente 6,27 g/L. Em contrapartida, a levedura PE-2 foi a que produziu menores quantidade de glicerol. Após 48 h a concentração de glicerol foi de 3,31 g/L para essa levedura. As leveduras FT-858, BG-1 e JP-1 produziram, 5,34 g/L, 5,21 g/L e 4,4 g/L, respectivamente.

Com base nos dados apresentados para produção de glicerol, percebe-se uma similaridade nas fermentações com os hidrolisados de arroz comercial e de arroz gigante. Para os dois casos a levedura que levou a uma maior formação do coproduto glicerol foi a SA-1, seguida da CAT-1 e da FT-858. A única diferença encontrada para as fermentações desses dois hidrolisados com relação a concentração final de glicerol foi que, no caso do arroz comercial, a levedura que levou a quarta maior concentração desse coproduto foi a JP-1, e no caso do arroz gigante, foi a levedura BG-1. A menor concentração de glicerol obtida tanto para o hidrolisado de arroz comercial quanto para o hidrolisado de arroz gigante foi para a fermentação com a levedura PE-2.

Após analisar os perfis de concentração para o consumo de glicose, produção de etanol e glicerol para as fermentações com o hidrolisado de arroz gigante, calculou-se o rendimento das fermentações, os fatores de conversão de glicose em etanol ( $Y_{E/S}$ ), fatores de conversão de glicose em glicerol ( $Y_{G/S}$ ), produtividades e velocidades de consumo do substrato. Os resultados obtidos estão apresentados a Tabela 7.

**Tabela 7.** Parâmetros das Fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz gigante com as diferentes linhagens da *Saccharomyces cerevisiae*.

	<b>BG-1</b>	<b>CAT-1</b>	<b>FT-858</b>	<b>JP-1</b>	<b>PE-2</b>	<b>SA-1</b>
Etanol obtido (g/L)	63,61	65,85	66,13	65,16	54,10	57,80
Glicerol obtido (g/L)	5,21	6,27	5,34	4,40	3,31	7,20
Rendimento (%)	91,9	94,4	94,8	93,8	85,2	83,3
$Y_{E/S}$	0,470	0,483	0,485	0,479	0,435	0,426
$Y_{G/S}$	0,038	0,046	0,039	0,032	0,027	0,053
Produtividade (g <sub>etanol</sub> /L.h)	1,33	1,37	1,38	1,36	1,13	1,20
Vel. consumo substrato (g <sub>glicose</sub> /L.h)	2,82	2,84	2,84	2,83	2,59	2,83
Glicose residual (g/L)	1,031	0,000	0,000	0,560	12,258	0,720

Com base nos parâmetros obtidos para as fermentações com as 6 diferentes linhagens da *Saccharomyces cerevisiae* apresentados na Tabela 7, a levedura que apresentou maior rendimento foi a FT-858, com 94,8%, e concentração final de etanol de 66,13 g/L. Após 48 h de fermentação, o substrato havia sido totalmente consumido, e a concentração final de glicerol, como apresentado anteriormente na Figura 20, foi de 5,34 g/L. A CAT-1 apresentou o segundo maior rendimento, 94,4%, com consumo total da glicose, concentração final de etanol de 65,85 g/L e concentração final de glicerol de 6,27 g/L. Com base nas curvas de produção de etanol para as fermentações realizadas com essas duas leveduras, como mostrado na Figura 20, percebe-se que estatisticamente a concentração final de etanol foi a mesma, uma vez que o erro obtido pelo desvio padrão das amostras analisadas com 48 h de fermentação foi elevado e estão sobrepostos. Além disso, a produtividade foi similar para as duas leveduras, 1,38 g<sub>etanol</sub>/L.h para a levedura FT-858 e 1,37 g<sub>etanol</sub>/L.h para a CAT-1. A velocidade de consumo do substrato foi a mesma, 2,84 g<sub>glicose</sub>/L.h.

Industrialmente, a levedura CAT-1 é bastante utilizada nas fermentações do caldo de cana-de-açúcar. Um dos motivos é a tolerância ao alumínio do mosto de caldo de cana. A FT-858 também se mostrou tolerante ao alumínio do mosto, sendo igualmente utilizada na redução dos problemas causados por esse metal durante a fermentação.<sup>57, 58</sup>

Os parâmetros obtidos para a fermentação com a JP-1 foram melhores em comparação a levedura BG-1. O rendimento obtido para a fermentação com a levedura JP-1 foi de 93,8% e com a levedura BG-1 foi de 91,9%. As concentrações finais de etanol foram, respectivamente, 65,16 g/L e 63,61 g/L. Essas duas leveduras não foram capazes de converter toda a glicose em etanol, uma vez que após 48 h de fermentação o meio ainda continha o substrato. A concentração de glicose residual foi maior para a levedura BG-1, 1,031 g/L, em comparação a JP-1, com concentração de glicose residual de 0,560 g/L. Além disso, a produtividade do processo foi menor para a BG-1, 1,33 g<sub>etanol</sub>/L·h, e 1,36 g<sub>etanol</sub>/L·h para a JP-1. A velocidade de consumo do substrato foi similar, 2,82 g<sub>glicose</sub>/L·h para a levedura BG-1 e 2,83 g<sub>glicose</sub>/L·h para a JP-1.

A levedura PE-2 apresentou rendimento de 85,2%. Apesar de ter produzido a menor quantidade de glicerol, 3,31 g/L, essa levedura apresentou o menor consumo de glicose, uma vez que após 48 h de fermentação a concentração obtida de glicose residual no meio foi de 12,258 g/L. Conforme apresentado anteriormente na Figura 20, durante toda a fermentação essa levedura produziu concentrações menores de etanol em comparação as demais linhagens, obtendo-se o menor valor de produtividade 1,13 g<sub>etanol</sub>/L·h. A velocidade de consumo do substrato foi de 2,59 g<sub>glicose</sub>/L·h.

A fermentação realizada com a levedura SA-1 apresentou o menor rendimento de fermentação de 83,3%. A concentração final de etanol foi de 57,80 g/L. Além de não ter sido capaz de consumir todo o substrato, essa levedura levou a maior concentração final de coproduto, como mencionado anteriormente. Ao final das 48 h de fermentação o meio possuía uma concentração de glicose residual de 0,720 g/L e uma concentração de glicerol de 7,20 g/L. A velocidade de consumo do substrato foi de 2,83 g<sub>glicose</sub>/L·h. Essa levedura levou a segunda menor produtividade 1,20 g<sub>etanol</sub>/L·h.

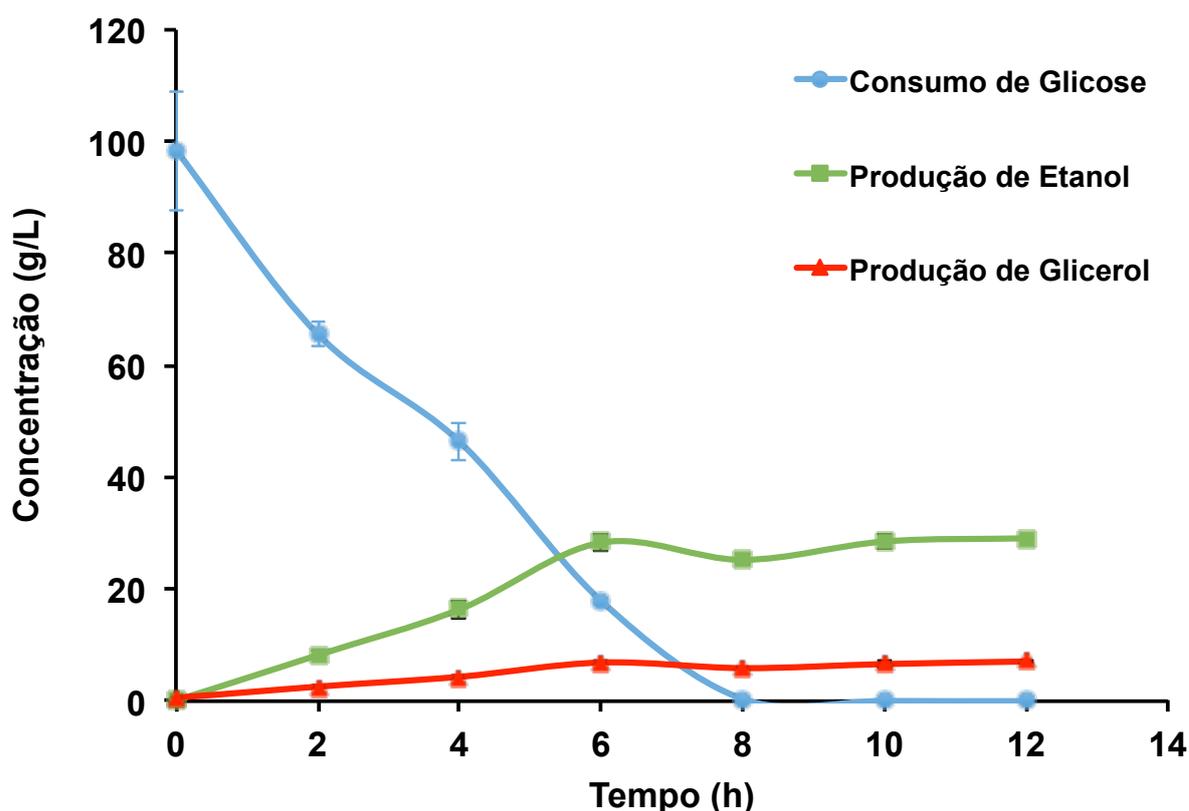
### **5.2.3. Fermentações Conduzidas no Sistema de Fermentação Dasgip Bioblock**

A escolha teve como base nos resultados apresentados para as fermentações conduzidas em erlenmeyers com a utilização de shaker orbital, e com base nas linhagens comerciais mais utilizadas industrialmente.

As leveduras SA-1 e CAT-1 foram as que obtiveram maior rendimento para a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial. Entretanto, o consumo total da glicose e a menor concentração do coproduto foram obtidos para a fermentação com a CAT-1. Para as fermentações com o hidrolisado de arroz gigante, os maiores rendimentos foram obtidos para as leveduras FT-858 e CAT-1. Apesar das duas leveduras terem consumido totalmente a glicose, e da levedura FT-858 ter levado a menor formação de glicerol, as reações de fermentação em reator foram realizadas com a levedura CAT-1, já que foi o segundo maior rendimento para ambos os hidrolisados. Além disso, a linhagem CAT-1 é uma das mais utilizadas nas indústrias brasileiras de produção de etanol combustível. Isso por que essa levedura é mais adaptada às condições industriais. Proporciona maior rendimento de etanol, menor quantidade de açúcar residual, e não flocula.<sup>57</sup>

#### **5.2.3.1 Fermentações conduzidas no Sistema de Fermentação com hidrolisado de Arroz Comercial**

As reações com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado foram realizadas em um sistema de fermentação, com controle de temperatura, agitação e pH. O inóculo foi feito com 15% da levedura CAT-1 em relação a concentração de glicose no hidrolisado. Alíquotas foram retiradas com os seguintes tempos reacionais: 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h e 24 h. O consumo de glicose com relação ao tempo, bem como a produção de etanol e glicerol para a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial, estão representados na Figura 22.



**Figura 22.** Curvas referentes ao consumo de glicose, produção de etanol e produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial.

Com base nos resultados apresentados na Figura 22 percebe-se que inicialmente a concentração de glicose presente no hidrolisado de arroz comercial era de aproximadamente 100 g/L. A curva referente ao consumo de glicose demonstra uma cinética rápida de reação, uma vez que com duas horas de fermentação 33% da glicose presente no hidrolisado já havia sido consumida. Com duas horas de fermentação, a concentração de etanol produzido era em torno de 8,2 g/L, o que corresponde a aproximadamente 25% da sua concentração final. Com 8 h de fermentação, já não havia glicose no meio. Como o consumo total de glicose ocorreu com 8 horas de fermentação, plotou-se o gráfico até 12 horas de fermentação, uma vez que após o consumo completo da glicose, a concentração de etanol e glicerol permanece constante. Após 12 h de fermentação, obteve-se aproximadamente 29,0 g/L de etanol. A concentração de glicerol após 12h de fermentação foi de 7,1 g/L.

O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) para fermentação com o hidrolisado de arroz comercial foi de 0,296 g/g e o rendimento da fermentação (R) foi de 57,9%, e a produtividade foi de 2,4 g<sub>etanol</sub>/L.h, demonstrando que apesar de todo o substrato, a glicose, ter sido consumido com 8 h de fermentação, não foi totalmente transformado no produto etanol, houve a formação de coprodutos de fermentação, como o glicerol.

O valor do rendimento obtido da fermentação a partir do arroz comercial foi baixo em comparação aos valores encontrados na literatura para produção de etanol a partir do milho. Plantas eficientes de produção de etanol a partir do milho são capazes de converter de 90 a 97% do teor de amido em etanol.<sup>63</sup> Porém, o presente trabalho não propôs uma otimização do processo fermentativo, o qual teoricamente determinaria as melhores condições para se obter um maior rendimento de etanol e menor quantidade de glicerol ao final da fermentação.

O glicerol é o principal coproduto nas fermentações com *S. cerevisiae*. Maiores quantidades de glicerol são formadas quando o meio fermentativo apresenta concentrações elevadas de sais, ocasionando um estresse osmótico para a levedura. Além disso, a produção de glicerol é maior em meios ricos em glicose.<sup>33</sup> Como falado anteriormente, fatores como pH, temperatura, tempo de fermentação, taxa de agitação e presença de contaminantes podem interferir na conversão de açúcar em etanol pela ação das leveduras, diminuindo o rendimento de etanol e levando a uma maior formação do coproduto glicerol.<sup>16, 47</sup>

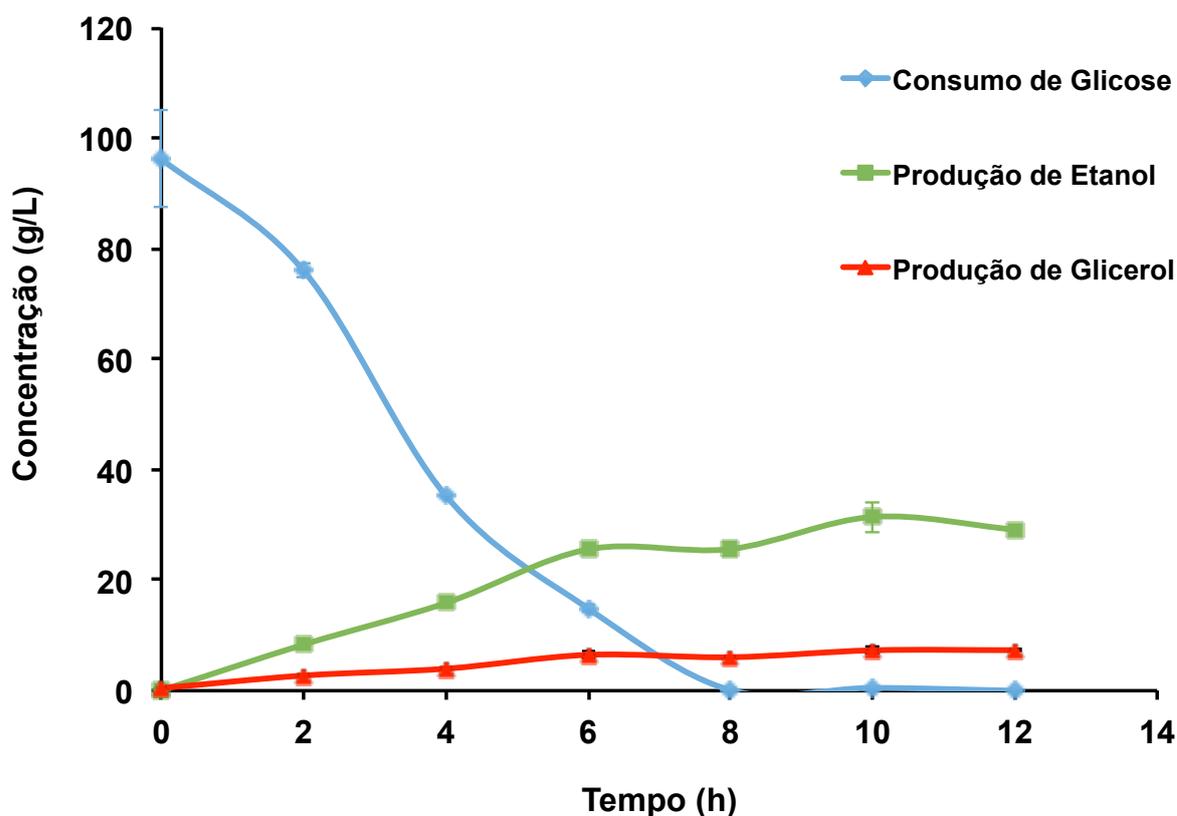
É importante frisar que rendimento do processo de fermentação realizada em erlenmeyer com a levedura CAT-1 para o hidrolisado de arroz comercial foi de 92,7%, valor semelhante aos rendimentos obtidos em escala industrial.<sup>57</sup>

A fermentação realizada em erlenmeyer de 250 mL continha volume de hidrolisado de 140 mL, ocupando-se 56% do volume total, propiciando as reações anaeróbicas, produção de etanol. A fermentação realizada no reator de 1 L continha 300 mL do hidrolisado, ocupando-se 30% do volume total. A maior quantidade de oxigênio favoreceu o crescimento celular, obtendo-se rendimento menor de etanol. Além disso, o inóculo para as fermentações em erlenmeyer foi feito com 20% de levedura em relação a quantidade de açúcar no hidrolisado, para a fermentação no reator, o inóculo foi feito com 15 % de levedura em relação a quantidade de açúcar. A quantidade menor de levedura inoculada para a fermentação interfere no

rendimento de etanol uma vez que a levedura inicialmente utiliza a glicose para crescimento celular. Dessa forma, para aumento do rendimento para a fermentação realizada em reator, seriam necessárias mais etapas de otimização do processo.

### 5.2.3.2 Fermentações conduzidas no Sistema de Fermentação com hidrolisado de Arroz Gigante

As reações foram realizadas com o hidrolisado de arroz gigante centrifugado em um sistema de fermentação, com controle de temperatura, agitação e pH. O inóculo foi feito com 15% da levedura CAT-1 em relação a concentração de glicose no hidrolisado. Alíquotas foram retiradas com os seguintes tempos reacionais: 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h e 24 h. O consumo de glicose com relação ao tempo, bem como a produção de etanol e glicerol para a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial, estão representados na Figura 23.



**Figura 23.** Curvas referentes ao consumo de glicose, produção de etanol e produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz gigante.

Com base nos resultados apresentados na Figura 23, percebe-se que inicialmente a concentração de glicose presente no hidrolisado de arroz gigante era de aproximadamente 96 g/L. A curva referente ao consumo de glicose demonstra uma cinética rápida de reação, porém um pouco mais lenta em relação a fermentação com hidrolisado de arroz comercial (Figura 22). Com duas horas de fermentação 21% da glicose presente no hidrolisado já havia sido consumida e 28% de etanol (8,4 g/L) com relação a sua concentração final já havia sido produzido. Com 8 h de fermentação, já não havia glicose no meio. Dessa forma, como o consumo total de glicose ocorreu com 8 horas de fermentação, plotou-se o gráfico até 12 horas, já que após o consumo completo da glicose, a concentração de etanol e glicerol permanece constante. Após 12 h de fermentação, obteve-se aproximadamente 29,15 g/L de etanol. O glicerol foi um coproduto da fermentação, e sua concentração após 12 h de fermentação foi de 7,3 g/L.

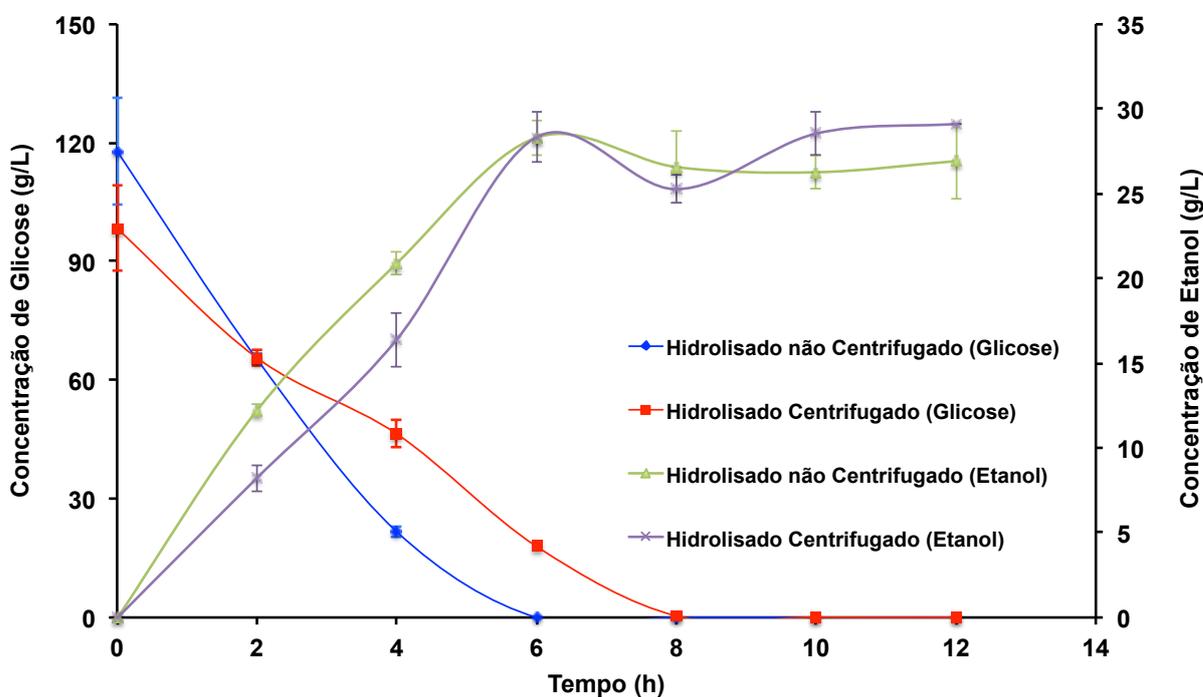
O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) para fermentação com o hidrolisado de arroz gigante foi de 0,303 g/g e o rendimento da fermentação (R) foi de 59,2%. Apesar de todo o substrato ter sido consumido com 8 h de fermentação, não foi totalmente transformado no produto etanol. Além disso, a velocidade de consumo do substrato foi de 8,0 g<sub>glicose</sub>/L·h e a produtividade foi de 2,4 g<sub>etanol</sub>/L·h.

Assim como para a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial, o valor do rendimento da fermentação com o hidrolisado de arroz gigante foi baixo em comparação aos rendimentos de plantas eficientes de produção de etanol a partir do milho (90 a 97 %).<sup>48</sup> Além disso, como mencionado anteriormente, a concentração do inóculo e o volume de hidrolisado em relação ao volume total do reator favorecem a produção de etanol ou o crescimento celular. O rendimento obtido para a fermentação realizada em erlenmeyer com o hidrolisado de arroz gigante e a levedura CAT-1, foi de 94,4%, próximo aos rendimentos obtidos em escala industrial, uma vez que ocupou-se 56% do volume total do erlenmeyer, favorecendo a fermentação anaeróbia, e o inóculo foi feito com 20% de levedura em relação a quantidade de glicose. Para a fermentação em reator, obteve-se o rendimento de 59,6%, porém, ocupou-se apenas 30% do volume do total do reator com o hidrolisado, o que favorece o crescimento celular. Além disso, o inóculo foi feito com menos quantidade de levedura, utilizou-se 15% de levedura em relação a quantidade de glicose. Dessa forma, uma otimização da fermentação em reator

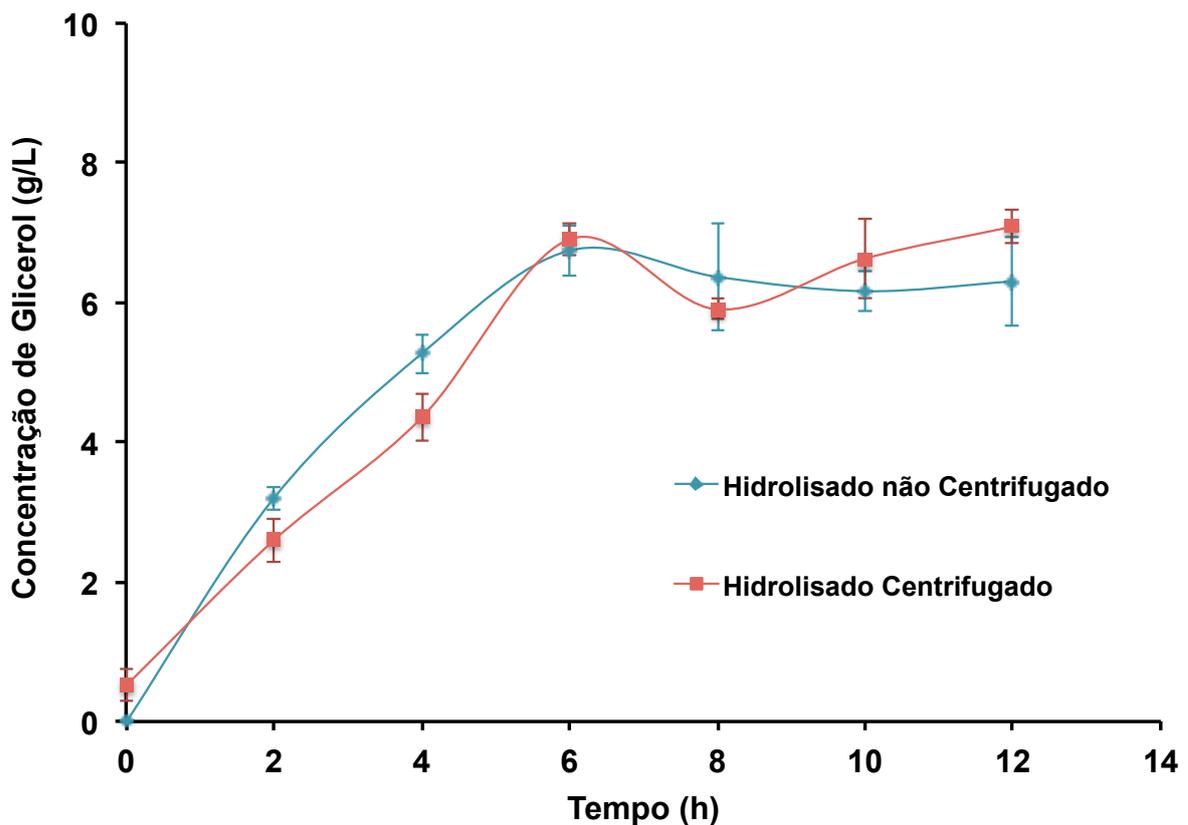
possivelmente determinaria as melhores condições para se obter um melhor rendimento de etanol.

### 5.2.3.3 Comparação das Fermentações Conduzidas no Sistema de Fermentação com Hidrolisado de Arroz Comercial Centrifugado e não Centrifugado

Para comparar o comportamento das fermentações com os hidrolisados de arroz comercial centrifugado e não centrifugado, onde o processo centrifugado refere-se ao substrato que passa por uma etapa de centrifugação após a hidrólise, para a remoção de fibras e amido não hidrolisado, o processo não centrifugado é realizado com o hidrolisado sem nenhum tratamento após a hidrólise, ou seja o substrato ainda contém particulados, plotou-se um gráfico demonstrando o consumo de glicose e a produção de etanol (Figura 24), bem como a curva referente a produção de glicerol (Figura 25).



**Figura 24.** Curvas referentes ao consumo de glicose e produção de etanol, durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado e não centrifugado.



**Figura 25.** Curvas referentes a produção de glicerol durante a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado e não centrifugado.

Com base na Figura 24, percebe-se que apesar da concentração inicial de glicose não ser a mesma, aproximadamente 100 g/L para o hidrolisado de arroz comercial centrifugado e 117 g/L para o hidrolisado não centrifugado, valores absolutos, porém estes valores são estatisticamente iguais, o perfil de fermentação foi similar. Contudo, o consumo de glicose ocorreu mais rapidamente para o hidrolisado não centrifugado, levando a uma cinética de reação mais rápida em comparação ao hidrolisado centrifugado. Após 6 h de fermentação com o hidrolisado não centrifugado, a glicose já havia sido totalmente consumida. Em contrapartida, o consumo total de glicose para o hidrolisado centrifugado só ocorreu com 8 h de fermentação.

As curvas referentes a produção de glicerol (Figura 25) demonstram que a concentração final de glicerol após 12 h de fermentação com o hidrolisado não centrifugado foi de aproximadamente 7,1 g/L e 6,3 g/L com o hidrolisado não centrifugado. Esses valores foram maiores em comparação a concentração final de

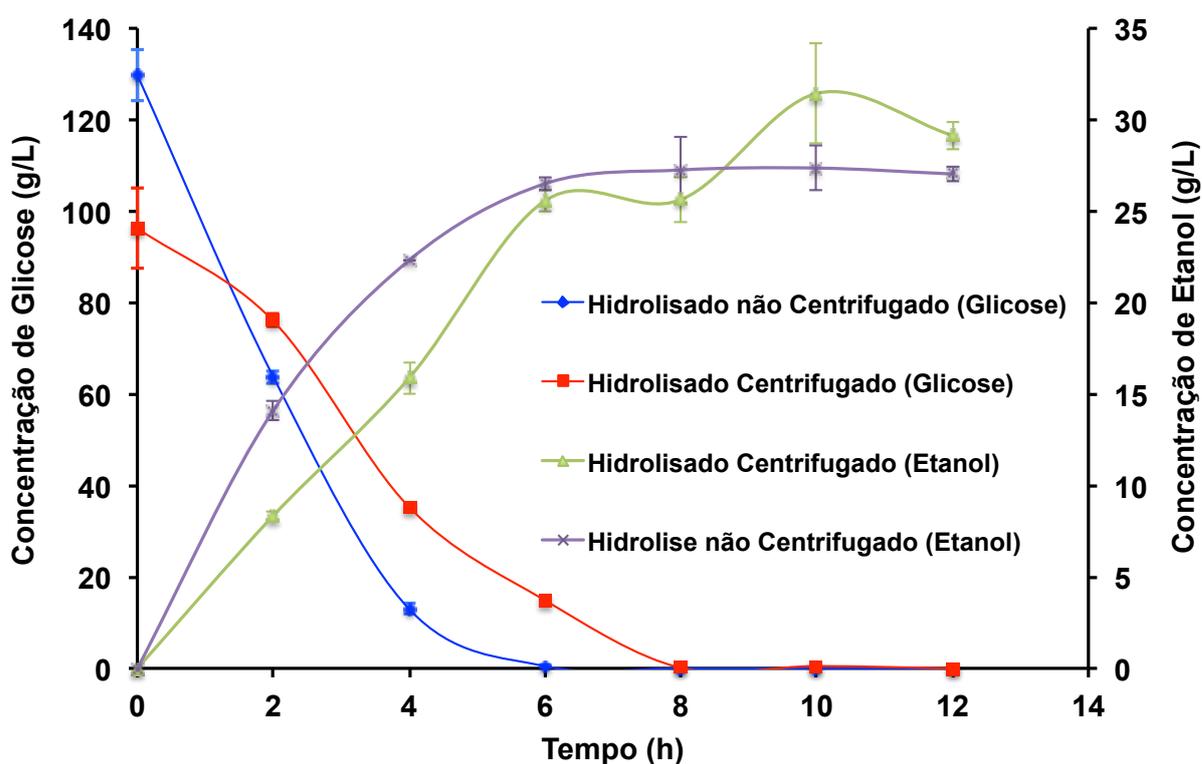
glicerol para a fermentação realizada com a mesma levedura, (CAT-1), em erlenmeyer. Com 48 h de fermentação no erlenmeyer, a concentração de glicerol obtida foi de aproximadamente 5 g/L, demonstrando que para a fermentação realizada no reator a levedura encontrava-se mais estressada, levando a uma maior produção de glicerol. Concentrações de etanol acima de 10% (v/v) tornam-se limitantes nas fermentações industriais com a *S. cerevisiae*.<sup>56</sup>

Apesar da glicose ter sido consumida mais rapidamente na fermentação com o hidrolisado de arroz comercial não centrifugado, uma maior conversão em etanol ocorreu para o hidrolisado centrifugado. Após 12 h de fermentação, a concentração final de etanol para o hidrolisado de arroz centrifugado foi de aproximadamente 29,11 g/L e para o hidrolisado não centrifugado foi de 26,91 g/L. O glicerol foi um coproduto de ambas as fermentações, e sua concentração após 24h de fermentação foi de 7,1 g/L para o hidrolisado centrifugado e 6,3 g/L para o hidrolisado não centrifugado.

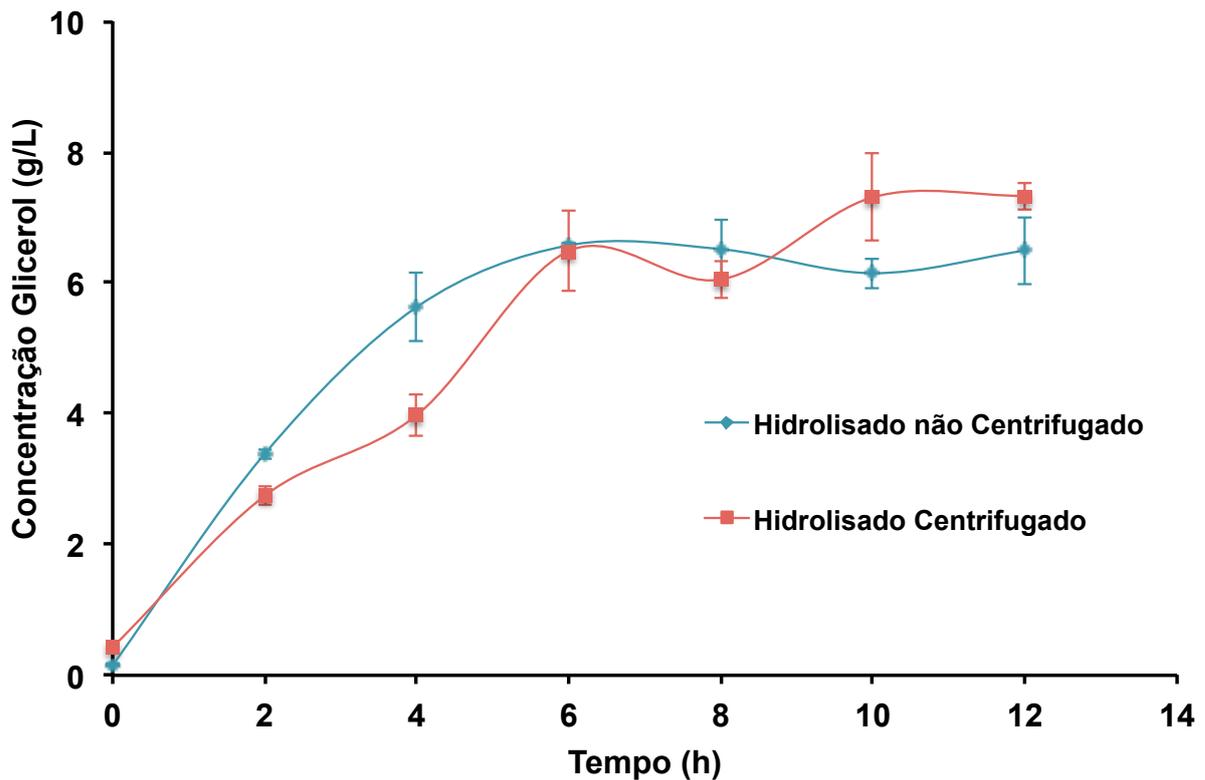
O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) para fermentação com o hidrolisado de arroz comercial centrifugado foi de 0,296 g/g, o rendimento da fermentação (R) foi de 57,9%, e a produtividade foi de 2,4 g<sub>etanol</sub>/L·h, como apresentado anteriormente. O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) para fermentação com o hidrolisado de arroz comercial não centrifugado foi de 0,229 g/g, o rendimento da fermentação (R) foi de 44,7% e a produtividade foi de 2,2 g<sub>etanol</sub>/L·h. Dessa forma, houve uma diminuição na via metabólica da levedura durante a fermentação com o hidrolisado de arroz não centrifugado, levando a uma menor eficiência na conversão de açúcar em etanol. Isso porquê ao centrifugar o hidrolisado, a glicose obtida pela quebra das ligações glicosídicas do amido permanece na etapa de fermentação, porém outras substâncias presentes no arroz que não foram hidrolisadas são removidas do meio, como por exemplo amido residual, fibras, proteínas e minerais, o que leva a uma resistência do contato da levedura com a glicose.

### 5.2.3.4 Comparação das Fermentações com Hidrolisado de Arroz Gigante Centrifugado e não Centrifugado, conduzidas no Sistema de Fermentação.

As Figuras 26 e 27 apresentam os perfis consumo de glicose e produção de etanol e produção de glicerol, respectivamente, em fermentações conduzidas com os hidrolisados de arroz gigante centrifugado e não centrifugado.



**Figura 26.** Curvas referentes ao consumo de glicose e produção de etanol, para as fermentações realizadas com os hidrolisados de arroz gigante centrifugado e não centrifugado.



**Figura 27.** Curvas referentes a produção de glicerol para as fermentações realizadas com os hidrolisados de arroz gigante centrifugado e não centrifugado.

De acordo com a Figura 26, observa-se embora as concentrações iniciais de glicose sejam diferentes (aproximadamente 96 g/L no hidrolisado de arroz gigante centrifugado e 130 g/L no hidrolisado não centrifugado), o comportamento da fermentação foi similar. Porém, após 6 h de fermentação com o hidrolisado não centrifugado, a glicose já havia sido totalmente consumida, para o hidrolisado centrifugado o consumo total de glicose só ocorreu com 8 h de fermentação.

As curvas referentes a produção de glicerol (Figura 27) demonstram que a concentração final de glicerol após 12 h de fermentação com o hidrolisado de arroz gigante centrifugado foi de aproximadamente de 7,3 g/L e com o hidrolisado de arroz gigante não centrifugado 6,5 g/L. Em comparação a concentração final de glicerol para a fermentação realizada com a mesma levedura, (CAT-1), em erlenmeyer, o valor obtido foi elevado. Com 48 h de fermentação no erlenmeyer, a concentração de glicerol foi de aproximadamente 4,5 g/L, demonstrando que, assim como para a fermentação com o hidrolisado de arroz comercial, a fermentação realizada no reator

apresentava condições adversas para a levedura levando a uma maior produção de glicerol.

Apesar da glicose ter sido consumida mais rapidamente na fermentação com o hidrolisado de arroz gigante não centrifugado, após 12 h de fermentação, a concentração final de etanol foi maior para a fermentação realizada com o hidrolisado centrifugado, cerca de 29,15 g/L, e para o hidrolisado não centrifugado aproximadamente 27 g/L. O glicerol foi um coproduto de ambas as fermentações, e sua concentração após 12h de fermentação foi de 7,3 g/L para o hidrolisado centrifugado e 6,5 g/L para o hidrolisado não centrifugado.

O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) para fermentação com o hidrolisado de arroz gigante centrifugado foi de 0,303 g/g, o rendimento da fermentação (R) foi de 59,2%, e a produtividade foi de 2,4 g<sub>etanol</sub>/L·h como apresentado anteriormente. O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) para fermentação com o hidrolisado de arroz gigante não centrifugado foi de 0,208 g/g, o rendimento da fermentação (R) foi de 40,7% e a produtividade foi de 2,3 g<sub>etanol</sub>/L·h. Dessa forma, houve uma diminuição no metabolismo da levedura durante a fermentação com o hidrolisado de arroz gigante não centrifugado, levando a uma menor conversão de açúcar em etanol, conseqüentemente, menor rendimento.

Esse comportamento foi observado para as duas fermentações com os hidrolisados não centrifugados de arroz comercial e arroz gigante, uma vez que outros componentes do arroz que não foram hidrolisados permanecem no meio, fazendo com que ocorra um maior impedimento do contato da levedura com a glicose. Entretanto, o valor da concentração final de etanol foi próximo para as fermentações com hidrolisados centrifugados e não centrifugados, tanto para o arroz gigante como para o arroz comercial. Para o processo de produção de etanol utilizando arroz como matéria-prima ser utilizado em escala industrial, a usina deve avaliar o emprego da etapa de centrifugação antes da fermentação ou ao final. Adotando-se a centrifugação do hidrolisado antes da fermentação, as proteínas das fibras do arroz não hidrolisado são removidas do processo, de forma que após a fermentação, a levedura pode ser recuperada separadamente e comercializada como proteína. Caso a etapa de centrifugação do hidrolisado não anteceda a fermentação, a levedura será recuperada juntamente com as proteínas das fibras do arroz ao final da fermentação.

## 6. SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE ARROZ COM ASPEN PLUS: AVALIAÇÃO PRELIMINAR

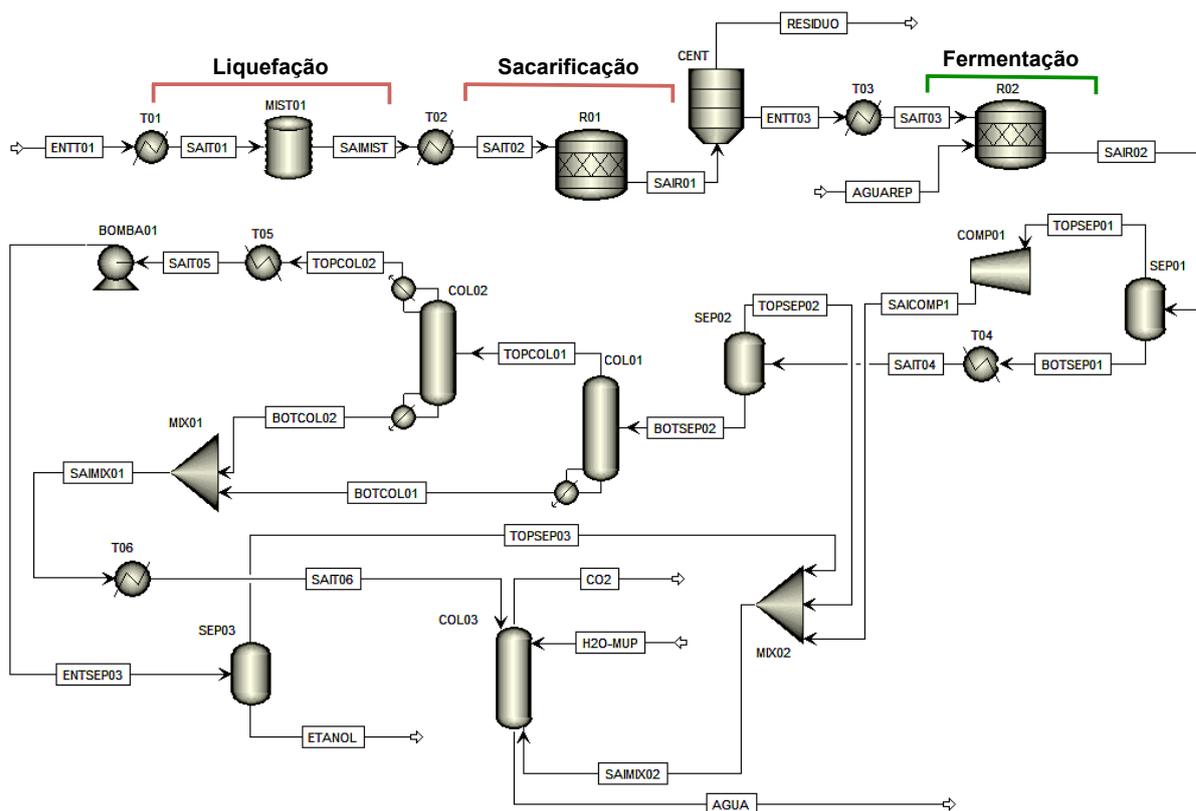
A simulação computacional é uma ferramenta bastante utilizada na resolução de equações que descrevem sistemas na Engenharia Química. O software Aspen Plus® é um simulador da AspenTech utilizado na indústria química para o desenvolvimento, otimização e acompanhamento de processos, os quais podem estar nos estados sólidos, líquido e gasoso. Além disso, com este simulador é possível avaliar o comportamento de processos químicos (batelada ou contínuo, em estado estacionário ou dinâmico) através dos balanços de massa, energia e quantidade de movimento, termodinâmica, equilíbrios químicos e cinética das reações. O software pode ser utilizado com o objetivo de se obter uma melhora nos rendimentos e na qualidade dos produtos, bem como melhor produtividade e redução de custos operacionais. Além disso, o programa é utilizado na otimização de processos em plantas de grande escala.<sup>64</sup>

Dessa forma, as fermentações realizadas em batelada com os hidrolisados de arroz comercial e arroz gigante em escala laboratorial foram utilizadas como parâmetro para modelagem e simulação do processo contínuo, por meio do software Aspen Plus®. Os componentes presentes no modelo proposto estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Componentes químicos presentes no processo do modelo proposto com a utilização do Aspen Plus®.

Nome	Fórmula
Água	H <sub>2</sub> O
Amido	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5-n</sub>
Dióxido de Carbono	CO <sub>2</sub>
Etanol	(C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O) <sub>2</sub>
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Glicose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Oxigênio	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5-n</sub>

Para a simulação do processo contínuo de produção de etanol a partir do arroz comercial e do arroz gigante, utilizou-se a abordagem proposta no fluxograma apresentado na Figura 28.



**Figura 28.** Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz comercial e arroz gigante como matéria-prima.

Com base no fluxograma apresentado para o processo contínuo de produção de etanol, e considerando as  $j$  correntes de entrada e saída, bem como os  $i$  componentes de entrada e saída, simplificou-se a representação do processo para determinar o balanço de massa global.



**Figura 29.** Esquema simplificado do processo contínuo de produção de etanol utilizando arroz comercial e arroz gigante como matéria-prima.

Levando-se em consideração os componentes ( $i$ ) e as correntes ( $j$ ) envolvidas no processo, o balanço global de massa é expresso por:

$$\sum_{j=1}^{NS} \sum_{i=1}^{NC} F_{i,j} \Big|_{Entrada} - \sum_{j=1}^{NS} \sum_{i=1}^{NC} F_{i,j} \Big|_{Saída} = 0$$

onde,  $NS$  corresponde ao número de correntes,  $NC$  é o número de componentes e  $F_{i,j}$  representa o fluxo do componente  $i$  na corrente  $j$ .

Dessa forma, simulou-se a produção de etanol para o arroz gigante e para o arroz comercial, adotando-se as quantidades e os rendimentos obtidos para as fermentações realizadas em batelada como parâmetro.

## 6.1 SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO ARROZ GIGANTE

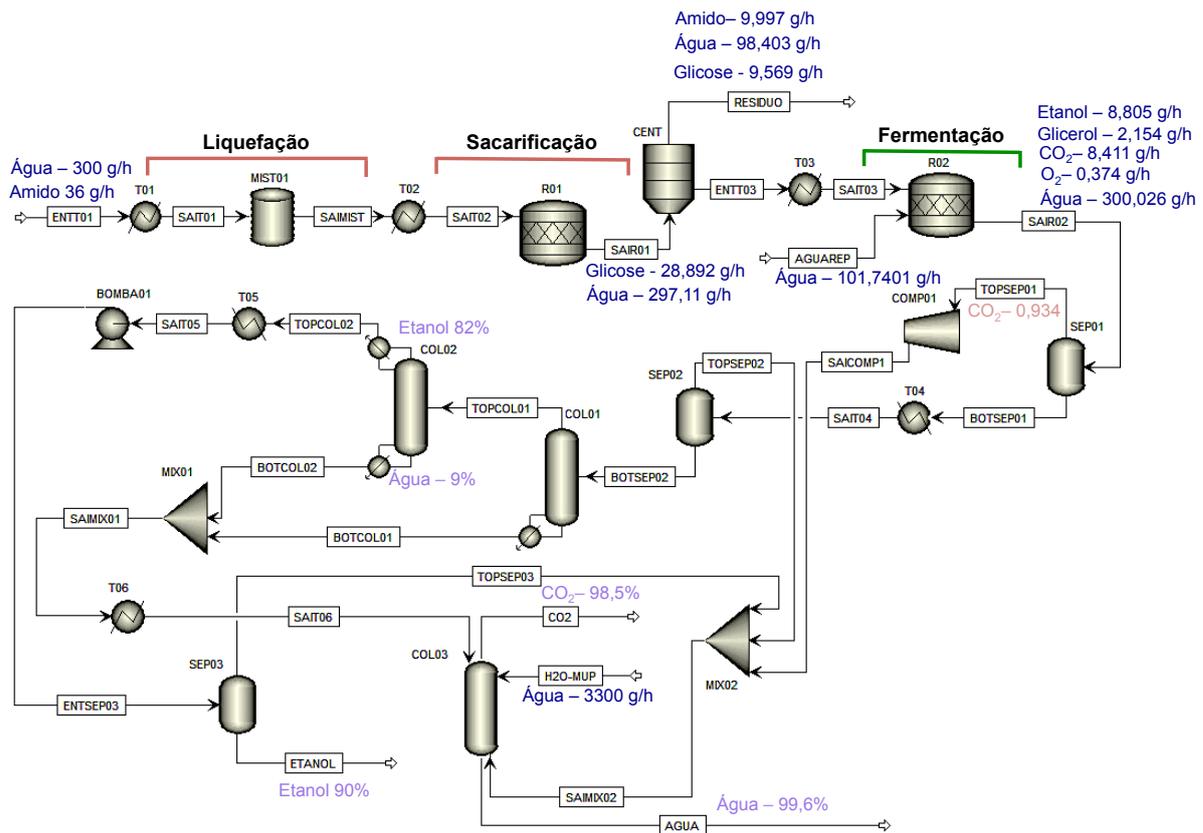
Após simulação do processo de obtenção de etanol utilizando como matéria-prima o arroz gigante de acordo com o fluxograma de processo apresentado na Figura 28, determinou-se o fluxo de massa nas correntes de entrada e saída, conforme Tabela 9, e as frações mássicas, conforme Tabela 10.

**Tabela 9.** Fluxo de massa nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante.

<b>Componentes</b>	<b>ENT01</b> (g/h)	<b>AGUAREP</b> (g/h)	<b>H<sub>2</sub>O-MUP</b> (g/h)	<b>SAIR01</b> (g/h)	<b>SAIR02</b> (g/h)	<b>RESIDUO</b> (g/h)	<b>AGUA</b> (g/h)	<b>ETANOL</b> (g/h)	<b>CO<sub>2</sub></b> (g/h)
ETANOL	0	0	0	0	8,805	0	5,512	3,293	2,095E-05
GLICOSE	0	0	0	28,892	0	9,569	0	0	0
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0	8,411	0	8,149	0,053	0,209
AGUA	300	101,740	3300	297,111	300,026	98,403	3599,720	0,309	0,0013
GLICEROL	0	0	0	0	2,154	0	2,154	0	1,81E-12
AMIDO	36	0	0	9,997	0	9,997	0	0	0
O <sub>2</sub>	0	0	0	0	0,374	0	0,371	0,0014	0,0018
<b>Temperatura (°C)</b>	25	32	15	60	32	60	15,36	35	15,31
<b>Pressão (atm)</b>	1	1	1,5	1	1	1	1,2	3	1,2

**Tabela 10.** Frações mássicas nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante.

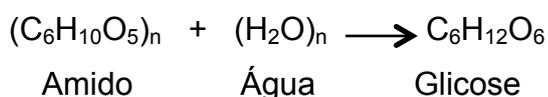
<b>Componentes</b>	<b>ENT01</b>	<b>AGUAREP</b>	<b>H<sub>2</sub>O-MUP</b>	<b>SAIR01</b>	<b>SAIR02</b>	<b>RESIDUO</b>	<b>AGUA</b>	<b>ETANOL</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>
ETANOL	0	0	0	0	0,028	0	0,002	0,901	9,88E-05
GLICOSE	0	0	0	0,086	0	0,081	0	0	0
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0	0,026	0	0,0023	0,015	0,985
AGUA	0,893	1	1	0,884	0,938	0,834	0,996	0,085	0,0059
GLICEROL	0	0	0	0	0,007	0	0,0006	0	8,53E-12
AMIDO	0,107	0	0	0,030	0	0,085	0	0	0
O <sub>2</sub>	0	0	0	0	0,001	0	0,0001	0,0004	0,0086
<b>Temperatura (°C)</b>	25	32	15	60	32	60	15,36	35	15,31
<b>Pressão (atm)</b>	1	1	1,5	1	1	1	1,2	3	1,2



**Figura 30.** Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz gigante como matéria-prima, com os respectivos fluxos e frações mássicas das correntes de entrada e saída.

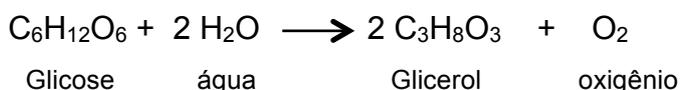
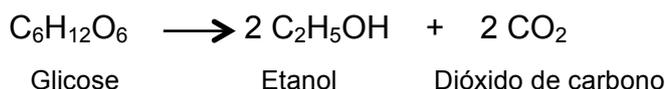
A primeira etapa do processo consiste na hidrólise do amido à glicose, para posterior fermentação. Conforme apresentado anteriormente para as hidrólises enzimáticas realizadas no reator, inicialmente adicionava-se 45 g do arroz previamente moído e 300 mL da solução tampão citrato de sódio. Considerando que 80% da composição do arroz corresponde amido, o fluxo mássico do componente Amido na corrente de entrada (ENT01 – Figura 30) corresponde a 36 g/h, e a 300 g/h de água (Tabela 9). A mistura é adicionada ao sistema a uma temperatura ambiente, 25 °C e pressão de 1 atm. Para a liquefação do amido, a mistura é aquecida a 90 °C por meio do primeiro trocador de calor (T01). Ao atingir a temperatura de interesse, a enzima Termamyl 2X é adicionada ao sistema, e a reação transcorre por 1 hora. Para a etapa de sacarificação, a mistura é resfriada para 60 °C por meio do segundo trocador de calor (T02). Adiciona-se a enzima AMG

300 mL e a reação transcorre por 3 horas. A reação química envolvida no processo de hidrólise, como demonstrada anteriormente é dada por:



Após a liquefação e sacarificação do amido a glicose, o fluxo mássico na corrente de saída do reator (SAIR01) de glicose de 28,892 g/h, de água é de 297,11 g/h e de amido não hidrolisado é de 9,997 g/h. A corrente é adicionada ao sistema de centrifugação (CENT) para remoção do amido não hidrolisado, eliminado pela corrente de saída RESIDUO. O fluxo mássico de amido nessa corrente é de 9,997 g/h. Além disso, 98,403 g/L de água e 9,569 g/h de glicose também são removidas na corrente RESIDUO, apenas para obtenção dos rendimentos das fermentações realizadas anteriormente em reator.

O hidrolisado antes de ser transferido ao reator de fermentação, passa pelo trocador de calor (T03) para diminuição da temperatura de 60 °C, temperatura oriunda da etapa de sacarificação, para 32 °C. Uma corrente nomeada de AGUAREP com 101,740 g/h de água é adicionada ao fermentador (R02) para reposição da água retirada na etapa de centrifugação e para manter o fluxo de água inicial de 300 g/h. As reações envolvidas no processo de fermentação da glicose a etanol e glicerol são:



Após reação de fermentação, a corrente de saída do reator (SAIR02) apresenta fluxo mássico de etanol de 8,805 g/h, 2,154 g/h de glicerol, 8,411 g/L de dióxido de carbono, 0,374 g/h de oxigênio e 300,026 g/h de água. Os fluxos obtidos de etanol e glicerol correspondem aos valores das concentrações de etanol (29,4 g/L) e glicerol (7,2 g/L) para a fermentação do arroz gigante apresentada anteriormente na Figura 23. Após o processo fermentativo, a corrente de saída do fermentador (SAIR02) segue para as etapas de separação em vasos *flash* (SEP01 e SEP02) para recuperação de correntes ricas em CO<sub>2</sub>, colunas destilação (COL01 e COL02)

para obtenção de uma corrente rica em etanol de concentração próxima ao ponto de azeótropo em misturas etano/água, e uma torre de absorção para purificação final da corrente global de CO<sub>2</sub> no processo. A Tabela 11 apresenta as frações mássicas, das principais corrente de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante para compreensão das etapas de separação e purificação.

**Tabela 11.** Fração mássica em algumas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz gigante.

Componentes	SAIR02	TOPSEP01	BOTSEP01	BOTSEP02	TOPCOL02	ENTSEP03	AGUA	ETANOL	CO <sub>2</sub>
ETANOL	0,028	0,006	0,028	0,028	0,824	0,824	0,002	0,901	9,88E-05
GLICOSE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CO <sub>2</sub>	0,026	0,934	0,001	0,001	0,090	0,090	0,002	0,015	0,985
AGUA	0,938	0,020	0,964	0,964	0,077	0,077	0,996	0,085	0,006
GLICEROL	0,007	8,95E-10	0,007	0,007	4,05E-67	4,05E-67	0,001	0	8,53E-12
AMIDO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O <sub>2</sub>	0,001	0,039	0,000	0,000	0,008	0,008	0,000	0,000	0,009
<b>Temperatura (°C)</b>	32	32	32	75	80,43	50,54	15,36	35	15,31
<b>Pressão (atm)</b>	1	1	1	2,3	1,2	3	1,2	3	1,2

No primeiro vaso de separação *flash*, nomeado de SEP01, a maior fração de dióxido de carbono (0,934) sai na corrente de topo (TOPSEP01), por ser o componente mais leve, e segue para o compressor (COMP01), seguindo para o processo de purificação do CO<sub>2</sub>. A água e o etanol saem do separador SEP01, cuja corrente de fundo (BOTSEP01) também apresenta pequenas frações de CO<sub>2</sub> e glicerol, e seguem até o segundo separador (SEP02). A fração de CO<sub>2</sub> que ainda continha na corrente BOTSEP01, sai pelo topo do vaso *flash* (SEP02) para o processo de purificação do CO<sub>2</sub>, por meio da coluna de absorção (COL03, contendo três estágios teóricos de separação). As frações de água e etanol seguem para a coluna de destilação COL01 (contendo 10 estágios teóricos de separação). A maior fração de água sai na corrente BOTCOL01, da parte inferior da coluna (COL01), até a coluna de absorção (COL03) para ser utilizada na purificação do CO<sub>2</sub>. O etanol e uma fração menor de água saem do topo da coluna COL01, por meio da corrente TOPCOL01 até a coluna COL02 (contendo 20 pratos teóricos), onde ocorre a separação do etanol pelo topo da coluna com uma fração de 82%, e a água pela parte inferior da coluna, com uma fração mássica de 9%. O etanol segue pela

corrente ENTSEP03 até o terceiro separador (SEP03), e é obtido após o processo com uma fração mássica de 90%.

As correntes com o componente CO<sub>2</sub> se encontram no misturador MIX02 e seguem para a coluna de absorção COL03 por meio da corrente SAIMIX02. Uma corrente com fluxo mássico de 3300 g/h de água é adicionada a COL03 para purificação do CO<sub>2</sub>. Ao final do processo, o CO<sub>2</sub> apresenta fração mássica de 98,5%. A água sai do processo com uma fração mássica de 99,6%.

## 6.2 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DO ARROZ COMERCIAL

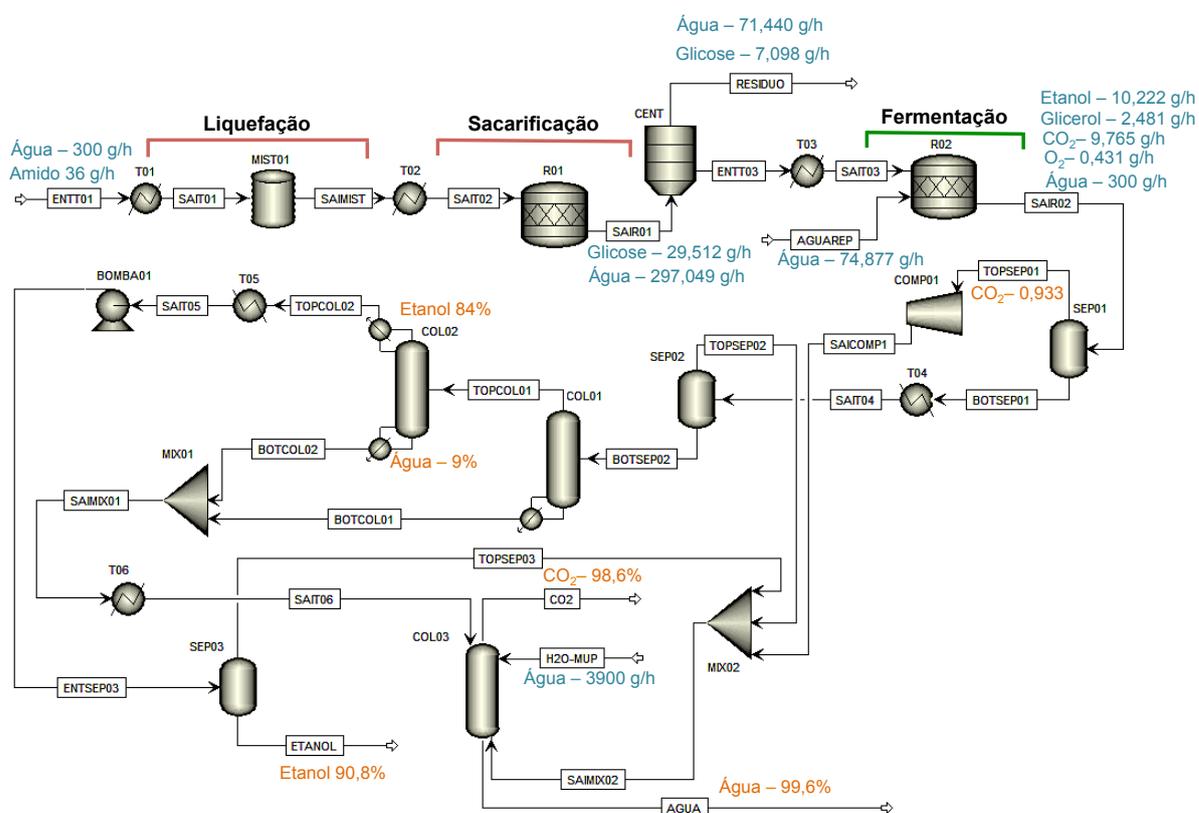
De maneira análoga e com base no fluxograma de processo apresentado na Figura 28, a obtenção de etanol utilizando como matéria-prima o arroz gigante foi avaliada com o auxílio do Aspen Plus, cujos fluxos mássicos das correntes de entrada e saída estão mostrados na Tabela 12, e as frações mássicas estão apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 12.** Fluxo mássico nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial.

Componentes	ENT01 (g/h)	AGUAREP (g/h)	H <sub>2</sub> O-MUP (g/h)	SAIR01 (g/h)	SAIR02 (g/h)	RESIDUO (g/h)	AGUA (g/h)	ETANOL (g/h)	CO <sub>2</sub> (g/h)
ETANOL	0	0	0	0	10,222	0	6,322	3,900	1,89E-05
GLICOSE	0	0	0	29,512	0,002	7,098	0,002	0	2,34E-22
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0	9,765	0	9,511	0,062	0,192
AGUA	300	74,877	3900	297,049	300	71,440	4199,670	0,330	0,001
GLICEROL	0	0	0	0	2,481	0	2,481	0	1,64E-12
AMIDO	36	0	0	9,439	0	9,439	0	0	0
O <sub>2</sub>	0	0	0	0	0,431	0	0,428	0,002	0,002
<b>Temperatura (°C)</b>	25	32	15	60	32	60	15,36	35	15,31
<b>Pressão (atm)</b>	1	1	1,5	1	1	1	1,2	3	1,2

**Tabela 13.** Frações mássicas nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial.

Componentes	ENT01	AGUAREP	H <sub>2</sub> O-MUP	SAIR01	SAIR02	RESIDUO	AGUA	ETANOL	CO <sub>2</sub>
ETANOL	0	0	0	0	0,032	0	0,0015	0,908267	9,70E-05
GLICOSE	0	0	0	0,088	5,21E-06	0,081	3,99E-07	0	1,20E-21
CO <sub>2</sub>	0	0	0	0	0,030	0	0,0023	0,014	0,986
AGUA	0,893	1	1	0,884	0,929	0,812	0,996	0,077	0,0059
GLICEROL	0	0	0	0	0,008	0	0,0006	0	8,42E-12
AMIDO	0,107	0	0	0,028	0	0,107	0	0	0
O <sub>2</sub>	0	0	0	0	0,001	0	0,0001	0,0004	0,008
<b>Temperatura (°C)</b>	25	32	15	60	32	60	15,36	35	15,31
<b>Pressão (atm)</b>	1	1	1,5	1	1	1	1,2	3	1,2



**Figura 31.** Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz comercial como matéria-prima, com os respectivos fluxos e frações mássicas das correntes de entrada e saída.

Inicialmente, o fluxo mássico do componente Amido na corrente de entrada (ENT01) corresponde a 36 g/h, e do componente Água 300 g/h. A mistura é adicionada ao sistema a uma temperatura ambiente, 25 °C e pressão de 1 atm. A

mistura é aquecida a 90 °C por meio do primeiro trocador de calor (T01), para a liquefação do amido. Transcorrido o tempo necessário para a liquefação, a mistura é resfriada para 60 °C por meio do segundo trocador de calor (T02) para a sacarificação e obtenção da glicose.

Após a etapa de hidrólise enzimática do amido à glicose, obteve-se fluxo mássico na corrente de saída do reator (SAIR01) do componente glicose de 29,512 g/h, do componente água de 297,049 g/h e do componente amido não hidrolisado de 9,439 g/h. A corrente é adicionada ao sistema de centrifugação (CENT) para remoção do amido não hidrolisado, o qual é eliminado pela corrente de saída RESIDUO, juntamente com 71,440 g/L de água e 7,098 g/h de glicose, somente para obtenção do rendimento da fermentação realizada anteriormente em reator.

Após centrifugação, o hidrolisado segue pela corrente ENT03 para o trocador de calor (T03) o qual diminui a temperatura para 32 °C. A água retirada na etapa de centrifugação é adicionada por meio de uma corrente nomeada de AGUAREP com fluxo de 74,877 g/h, para que o fluxo de água inicial de 300 g/h seja mantido.

A corrente de saída do reator (SAIR02), após reação de fermentação, apresenta fluxo mássico de etanol de 10,222 g/h, 2,481 g/h de glicerol, 9,765 g/L de dióxido de carbono, 0,431 g/h de oxigênio e 300 g/h de água. O fluxo obtido de etanol e glicerol correspondem aos valores das concentrações de etanol (34,0 g/L) e glicerol (8,3 g/L) para a fermentação em reator do arroz comercial apresentada anteriormente na Figura 22. A corrente de saída do fermentador (SAIR02) segue para as etapas de separação em vasos flash e em colunas de destilação e absorção. A Tabela 14 apresenta as frações mássicas, das principais corrente de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial para compreensão das etapas de separação e purificação.

**Tabela 14.** Fração mássica em algumas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz comercial.

Componentes	SAIR02	TOPSEP01	BOTSEP01	BOTSEP02	TOPCOL02	ENTSEP03	AGUA	ETANOL	CO <sub>2</sub>
ETANOL	0,032	0,007	0,032	0,032	0,842	0,842	0,001	0,908	9,70E-05
GLICOSE	5,21E-06	6,77E-19	5,37E-06	5,37E-06	1,29E-139	1,29E-139	3,99E-07	0	1,20E-21
CO <sub>2</sub>	0,030	0,933	0,001	0,001	0,079	0,079	0,002	0,014	0,986
AGUA	0,929	0,020	0,958	0,958	0,071	0,071	0,996	0,077	0,006
GLICEROL	0,008	1,03E-09	0,008	0,008	4,97E-67	4,97E-67	0,001	0	8,42E-12
AMIDO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O <sub>2</sub>	0,001	0,039	0,0001	0,0001	0,007	0,007	0,0001	0,0004	0,008
<b>Temperatura (°C)</b>	32	32	32	75	80,43	50,54	15,36	35	15,31
<b>Pressão (atm)</b>	1	1	1	2,3	1,2	3	1,2	3	1,2

No separador em único estágio (SEP01), a maior fração de dióxido de carbono (0,933) sai no topo da coluna (corrente TOPSEP01) e segue para o compressor (COMP01), e em seguida para o processo de purificação do CO<sub>2</sub>. A água e o etanol saem do separador SEP01, juntamente com frações pequenas de CO<sub>2</sub> e glicerol (corrente BOTSEP01) até o segundo separador *flash* (SEP02). A corrente de topo rica em CO<sub>2</sub> segue para purificação do CO<sub>2</sub>, por meio da coluna de absorção (COL03). As frações de água e etanol seguem para a coluna de destilação COL01. A maior fração de água sai na corrente BOTCOL01, da parte inferior da coluna (COL01), até a coluna de absorção (COL03) para ser utilizada na purificação do CO<sub>2</sub>. O etanol e uma fração menor de água saem do topo da coluna COL01, por meio da corrente TOPCOL01 até a coluna COL02, onde ocorre a separação do etanol pelo topo da coluna com uma fração de 84. O etanol segue pela corrente ENTSEP03 até o terceiro separador (SEP03), e é obtido após o processo com uma fração mássica de 90,8 %.

As correntes ricas em CO<sub>2</sub> se encontram no misturador MIX02 e seguem para a coluna de absorção COL03 por meio da corrente SAIMIX02. Uma corrente com fluxo mássico de 3900 g/h de água é adicionada a COL03 para purificação do CO<sub>2</sub>. Ao final do processo, o CO<sub>2</sub> apresenta fração mássica de 98,6%. A água sai do processo com uma fração mássica de 99,6%.

Como nas simulações realizadas com arroz gigante, nas simulações realizadas com arroz comercial tanto nas colunas de destilação quanto nas colunas de absorção foi empregado modelos rigorosos de separação usados para a resolução do sistema de equações MESH, que corresponde aos balanços de massa (M), equilíbrio termodinâmico (E), somatório das frações molares (S) e entalpia (H).

A análise preliminar para o processo de obtenção de etanol, utilizando como matéria-prima o arroz gigante e o arroz comercial, por meio da simulação com o simulador Aspen Plus® demonstrou os processos químicos e os balanços de massa envolvidos. Dessa forma, o modelo pode ser adotado objetivando-se o processo em grande escala, ou para melhorias na produtividade e aumento do rendimento de etanol.

## 7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 7.1 CONCLUSÕES

O arroz BRS AG, desenvolvido pela Embrapa Clima Temperado mostra-se apropriado para a produção de etanol combustível devido a quantidade elevada de amido na sua composição, comportamento satisfatório na hidrólise e não apresentar componentes inibitórios durante o processo fermentativo.

Após reações de hidrólise enzimática do amido, e com base no balanço de massa e na equação estequiométrica da conversão do amido em glicose, quantificou-se a quantidade de amido presente no arroz gigante. Obteve-se 80% de amido na composição do arroz gigante, valor similar aos encontrados na literatura e para o arroz comercial BRS Pampa.

A otimização do processo de hidrólise enzimática determinou que a reação na qual a etapa de liquefação do amido transcorreu por 1 h com a enzima Termamyl 2X, nas condições de 90 °C e pH 5,5, seguida da sacarificação por meio da enzima AMG 300 L por 3 h nas condições de 60 °C e pH 4,5 levou a maior concentração final de glicose. Obteve-se 130,16 g/L de glicose para a hidrólise do arroz comercial, e 133,28 g/L para a hidrólise do arroz gigante. Além disso, a etapa de liquefação do amido mostrou-se determinante na concentração final de glicose obtida.

O estudo das diferentes linhagens comerciais da *Saccharomyces cerevisiae* determinou que os maiores rendimentos e maiores concentrações de etanol foram obtidas para as leveduras SA-1 (93% e concentração de etanol de 58,92 g/L) e CAT-1 (92,7% e concentração de etanol de 58,93 g/L), para as fermentações realizadas com o hidrolisado de arroz comercial e FT-858 (94,8% e concentração de etanol de 66,13 g/L), e CAT-1 (94,4% e concentração de etanol de 65,85 g/L), para as fermentações com o hidrolisado de arroz gigante. Isso por que nas condições reacionais propostas, temperatura de 32 °C, agitação de 150 rpm, 56% do volume total do erlenmeyer com hidrolisado e inóculo com 20% de levedura em relação a concentração de glicose, essas leveduras atuaram de forma a se obter maior concentração do produto de interesse, etanol.

As fermentações conduzidas em reator, com levedura CAT-1, levaram ao rendimento de 57,9% e produtividade de 2,4 g<sub>etanol</sub>/L·h para o hidrolisado de arroz comercial e 59,2% de rendimento e produtividade de 2,94 g<sub>etanol</sub>/L·h para o

hidrolisado de arroz gigante. Os valores de rendimento foram baixos em comparação a plantas eficiente de produção de etanol a partir do milho, que possuem rendimento de 90% a 97%. Entretanto como as condições do meio reacional são determinantes para o metabolismo celular das leveduras, pode-se pressupor que a levedura encontrava-se em condições estressantes, que proporcionam um menor rendimento e maior formação de coprodutos. O volume ocupado no reator com os respectivos hidrolisados de arroz correspondia a 30% do volume total do reator. A maior quantidade de oxigênio propiciou o crescimento celular à fermentação anaeróbia para produção de etanol.

As fermentações conduzidas em reator, com os hidrolisados de arroz centrifugados e não centrifugados demonstraram que o valor obtido da concentração final de etanol é próximo em ambos os processos. A diferença está na cinética de reação, uma vez que o consumo de glicose ocorre mais rápido para o hidrolisado não centrifugado em comparação ao centrifugado. Além disso, apesar da concentração final de etanol ser similar, o rendimento para as fermentações com os hidrolisados não centrifugados foi menor. Ao realizar uma etapa de centrifugação do hidrolisado de arroz antes da fermentação, os componentes do arroz que não foram hidrolisados à glicose são removidos do meio reacional. Ao final da fermentação as leveduras podem ser separadas e comercializadas como proteínas, agregando valor ao processo. A presença de outros componentes do arroz que não foram hidrolisados para as fermentações em que não realizou-se a centrifugação, pode ocasionar um impedimento no contato da levedura com a glicose, e ao final da fermentação a levedura obtida por processo de separação juntamente com os demais componentes do arroz.

Para avaliação preliminar do processo de produção de etanol utilizando o arroz como matéria-prima, utilizou-se o simulador Aspen Plus® para modelagem e simulação. Os parâmetros obtidos para as fermentações realizadas em batelada, foram adotados no modelo proposto considerando-se um processo contínuo. A simulação proporcionou avaliar o fluxo mássico e as frações mássicas das correntes de entrada e saída de cada etapa. Dessa forma, o modelo pode ser utilizado para otimização do processo ou para avaliação do rendimento e produtividade em escala industrial.

## 7.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho possui como perspectivas futuras a identificação dos compostos mostrados nos cromatogramas referentes a otimização da etapa de hidrólise enzimática do amido presente no arroz comercial, com tempos de retenção 6,5 e 7,6 minutos. Confirmar se referem-se a maltotriose e a maltose.

Otimizar os parâmetros da fermentação em reator, com o objetivo de se obter um maior rendimento de etanol e menor formação de coprodutos.

Caracterizar os coprodutos de fermentação, com objetivo de se obter uma aplicabilidade e agregar valor ao processo.

Realizar mais estudos com a linhagem FT-858 na fermentação de arroz, uma vez que esta levedura é mais recomendada na produção de etanol de milho por metabolizar a maltotriose.

Simular o processo de obtenção de etanol utilizando como matéria-prima o arroz gigante e o arroz comercial em grande escala, por meio do software Aspen Plus®.

## 8. BIBLIOGRAFIA

[1] CINELLI, B. A., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G. & CASTRO, A. M. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. **Fuel**, v. 150, p. 721-729, 2015.

[2] ZHANG, L., ZHAO, H., GAN, M., JIN, Y., GAO, X., CHEN, Q., GUAN, J. & WANG, Z. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4573-4579, 2011.

[3] PIETRZAK, W. & KAWA-RYGIELSKA, J. Ethanol fermentation of waste bread using granular starch hydrolyzing enzyme: Effect of raw material pretreatment. **Fuel**, v. 134, p. 250-256, 2014.

[4] SCHOLZ, M. J., RILEY, M. R. & CUELLO, J. L. Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 59-65, 2013.

[5] DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROSSELL, C. E. V., MACIEL FILHO, R. & BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 152-161, 2012.

[6] KONDO, A., SHIGECHI, H., ABE, M., UYAMA, K., MATSUMOTO, T., TAKAHASHI, S., UEDA, M., TANAKA, A., KISHIMOTO, M. & FUKUDA, H. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 291-296, 2002.

[7] AJIBOLA, F. O., EDEMA, M. O. & OYEWOLE, O. B. Enzymatic Production of Ethanol from Cassava Starch Using Two Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nigerian Food Journal**, v. 30, n. 2, p. 114-121, 2012.

[8] RANI, P., SHARMA, S., GARG, F. C., RAJ, K. & WATI, L. **Ethanol Production from Potato Flour by *Saccharomyces cerevisiae***. 2010.

[9] MAGALHÃES JÚNIOR, A. M., FAGUNDES, P. R. R., FRANCO, D., ANDRES, A., NUNES, C. D. P., JOSÉ A., MARTINS, J. F., MORAES, O. P. & MOURA NETO, F. BRS AG: Cultivar de Arroz Irrigado Desenvolvida como Matéria-Prima para Produção de Álcool de Cereais e/ou Alimentação Animal. p. Comunicado Técnico 372, 2015. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/127678/1/Comunicado-327-web.pdf> >. Acesso em: 08 de Dezembro de 2015.

[10] MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. D., FAGUNDES, P. R. R., FRANCO, D. F., MORAIS, O. P. D., SIQUEIRA, F. G. D., STRECK, E. A., AGUIAR, G. A. & FACCHINELLO, P. H. K. BRS AG: first cultivar of irrigated rice used for alcohol production or animal feed. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 72-77, 2017.

[11] KASAVI, C., FINORE, I., LAMA, L., NICOLAUS, B., OLIVER, S. G., TOKSOY ONER, E. & KIRDAR, B. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 230-238, 2012.

- [12] DIAZ, J. T., CHINN, M. S. & TRUONG, V.-D. Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweetpotatoes for ethanol production and anthocyanins extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 53-60, 2014.
- [13] PIETRZAK, W. & KAWA-RYGIELSKA, J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat-rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. **Fuel**, v. 147, p. 236-242, 2015.
- [14] LOPES, M. L., PAULILLO, S. C. D. L., GODOY, A., CHERUBIN, R. A., LORENZI, M. S., GIOMETTI, F. H. C., BERNARDINO, C. D., AMORIM NETO, H. B. D. & AMORIM, H. V. D. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, Supplement 1, p. 64-76, 2016.
- [15] RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. World Fuel Ethanol production. 2016. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#14540%2099788442-e48b2782-ea53>. Acesso em: 30 de Maio de 2016.
- [16] MOHD AZHAR, S. H., ABDULLA, R., JAMBO, S. A., MARBAWI, H., GANSAU, J. A., MOHD FAIK, A. A. & RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
- [17] LAURINI, M. P. The spatio-temporal dynamics of ethanol/gasoline price ratio in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 70, p. 1-12, 2017.
- [18] GAUDER, M., GRAEFF-HÖNNINGER, S. & CLAUPEIN, W. The impact of a growing bioethanol industry on food production in Brazil. **Applied Energy**, v. 88, n. 3, p. 672-679, 2011.
- [19] PINTO, A. A., BICALHO, I. C., MOGNON, J. L., DUARTE, C. R. & ATAÍDE, C. H. Separation of *Saccharomyces cerevisiae* from alcoholic fermentation broth by two commercial hydrocyclones. **Separation and Purification Technology**, v. 120, p. 69-77, 2013.
- [20] TODHANAKASEM, T., NARKMIT, T., AREERAT, K. & THANONKEO, P. Fermentation of rice bran hydrolysate to ethanol using *Zymomonas mobilis* biofilm immobilization on DEAE-cellulose. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 196-201, 2015.
- [21] DA CUNHA-PEREIRA, F., HICKERT, L. R., SEHNEM, N. T., DE SOUZA-CRUZ, P. B., ROSA, C. A. & AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4218-4225, 2011.
- [22] WU, X., ZHANG, J., XU, E., LIU, Y., CHENG, Y., ADDY, M., ZHOU, W., GRIFFITH, R., CHEN, P. & RUAN, R. Microbial hydrolysis and fermentation of rice straw for ethanol production. **Fuel**, v. 180, p. 679-686, 2016.
- [23] PAES, M. C. D. & Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. . Sete Lagos, MG, p. Circular Técnica 75, 2006. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/fisquitecnolmilho\\_000f gb2k97i02wx5eo0bp3uwfl1aa0n7.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/fisquitecnolmilho_000f gb2k97i02wx5eo0bp3uwfl1aa0n7.pdf). Acesso em: 05 de Maio de 2017.
- [24] LE, L. T., VAN IERLAND, E. C., ZHU, X. & WESSELER, J. Energy and greenhouse gas balances of cassava-based ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 51, p. 125-135, 2013.

- [25] WIDODO, Y., WAHYUNINGSIH, S. & UEDA, A. Sweet Potato Production for Bio-ethanol and Food Related Industry in Indonesia: Challenges for Sustainability. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 493-500, 2015.
- [26] ZHANG, P., CHEN, C., SHEN, Y., DING, T., MA, D., HUA, Z. & SUN, D. Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 835-838, 2013.
- [27] JIN, Y., FANG, Y., ZHANG, G., ZHOU, L. & ZHAO, H. Comparison of ethanol production performance in 10 varieties of sweet potato at different growth stages. **Acta Oecologica**, v. 44, p. 33-37, 2012.
- [28] SILVA, W. M. F., BIDUSKI, B., LIMA, K. O., PINTO, V. Z., HOFFMANN, J. F., VANIER, N. L. & DIAS, A. R. G. Starch digestibility and molecular weight distribution of proteins in rice grains subjected to heat-moisture treatment. **Food Chemistry**, v. 219, p. 260-267, 2017.
- [29] AMAGLIANI, L., O'REGAN, J., KELLY, A. L. & O'MAHONY, J. A. Chemistry, structure, functionality and applications of rice starch. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 291-300, 2016.
- [30] BHAT, F. M. & RIAR, C. S. Effect of amylose, particle size & morphology on the functionality of starches of traditional rice cultivars. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 637-644, 2016.
- [31] SANTOS MICHEL JR, R. J., CANABARRO, N. I., ALESIO, C., MALESKI, T., LABER, T., SFALCIN, P., FOLETTI, E. L., MAYER, F. D., KUHN, R. C. & MAZUTTI, M. A. Enzymatic saccharification and fermentation of rice processing residue for ethanol production at constant temperature. **Biosystems Engineering**, v. 142, p. 110-116, 2016.
- [32] WALTER, M., MARCHEZAN, E. & AVILA, L. A. D. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1184-1192, 2008.
- [33] TAKITA, T. Breeding of a rice line with extraordinarily large grains as a genetic source for high yielding varieties. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 17, p. 93-97, 1983.
- [34] DENARDIN, C. C. & SILVA, L. P. D. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 945-954, 2009.
- [35] ALI, A., WANI, T. A., WANI, I. A. & MASOODI, F. A. Comparative study of the physico-chemical properties of rice and corn starches grown in Indian temperate climate. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 1, p. 75-82, 2016.
- [36] MALI, S. & LONDRINA, U. E. D. **Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização**. UEL, 2010.
- [37] TESTER, R. F., KARKALAS, J. & QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.
- [38] PARKER, R. & RING, S. G. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n. 1, p. 1-17, 2001.
- [39] KADOKAWA, J. Preparation and applications of amylose supramolecules by means of phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization. **Polymers**, v. 4, n. 1, p. 116-133, 2012.

- [40] BERTOFT, E., PIYACHOMKWAN, K., CHATAKANONDA, P. & SRIROTH, K. Internal unit chain composition in amylopectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 527-543, 2008.
- [41] PARASHAR, D. & SATYANARAYANA, T. Engineering a chimeric acid-stable  $\alpha$ -amylase-glucoamylase (Amy-Glu) for one step starch saccharification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 274-281, 2017.
- [42] TASIĆ, M. B., KONSTANTINOVIĆ, B. V., LAZIĆ, M. L. & VELJKOVIĆ, V. B. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 208-211, 2009.
- [43] MOSHI, A. P., HOSEA, K. M. M., ELISANTE, E., MAMO, G. & MATTIASSON, B. High temperature simultaneous saccharification and fermentation of starch from inedible wild cassava (*Manihot glaziovii*) to bioethanol using *Caloramator boliviensis*. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 128-136, 2015.
- [44] LIN, L., GUO, D., HUANG, J., ZHANG, X., ZHANG, L. & WEI, C. Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 246-254, 2016.
- [45] KEARSLEY, M. W. & DZIEDZIC, S. Z. **Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives**. Springer (December 31, 1995), 1995).
- [46] National Centre for Biotechnology Education- Amyloglucosidase. 2016. Disponível em: < <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/amyloglucosidase.html> >. Acesso em: 15 de Maio de 2017.
- [47] BREXÓ, R. P. & SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.
- [48] NUÑEZ-GUERRERO, M. E., PÁEZ-LERMA, J. B., RUTIAGA-QUIÑONES, O. M., GONZÁLEZ-HERRERA, S. M. & SOTO-CRUZ, N. O. Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* juice. **Food Microbiology**, v. 54, p. 91-97, 2016.
- [49] ARAÚJO, L. L. D. **Produção de álcool a partir de amido utilizando-se amilases recombinantes**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- [50] BAI, F. W., ANDERSON, W. A. & MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.
- [51] SOUZA, C. S. **Avaliação da Produção de Etanol em Temperaturas Elevadas por uma linhagem de *S. Cerevisiae***. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- [52] LEI, F., ROTBØLL, M. & JØRGENSEN, S. B. A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 205-221, 2001.
- [53] NOVOZYMES A/S. Ficha técnica do produto. 2007. Disponível em: < [http://www.inf.com.br/downloads/termamyl\\_2x.pdf](http://www.inf.com.br/downloads/termamyl_2x.pdf) >. Acesso em: 07 de Março de 2016.

- [54] NOVOZYMES A/S. Ficha aplicação do produto. Disponível em: < <http://www.mountainmoonshine.com/images/Saccharification.pdf> >. Acesso em: 07 de Março de 2016.
- [55] LABORATORIES, B.-R. Chromatography Aminex HPLC Columns. 2012. Disponível em: < [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6333.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6333.pdf) >. Acesso em: 15 de Maio de 2017.
- [56] MELO, H. F. D. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, **2006**.
- [57] REIS, V. R., ANTONANGELO, A. T. B. F., BASSI, A. P. G., COLOMBI, D. & CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 268-274, 2017.
- [58] FERMENTEC, Leveduras com habilidade melhorada que apresentam alta persistência e dominância. Disponível em: < <http://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=259> >. Acesso em: 12 de Maio de 2017.
- [59] LNF. Ficha de informação do produto, Levedura Seleccionada LNF BG-1. Disponível em: < [http://www.lnf.com.br/downloads/lnf\\_bg1.pdf](http://www.lnf.com.br/downloads/lnf_bg1.pdf) >. Acesso em: 14 de Maio de 2017.
- [60] LNF. Ficha de informação do produto, Levedura Seleccionada LNF FT-858. Disponível em: < [http://www.lnf.com.br/downloads/lnf\\_ft858.pdf](http://www.lnf.com.br/downloads/lnf_ft858.pdf) >. Acesso em: 14 de Maio de 2017.
- [61] LNF. Ficha de informação do produto, Levedura Seleccionada LNF SA-1. Disponível em: < [http://www.lnf.com.br/downloads/lnf\\_sa1.pdf](http://www.lnf.com.br/downloads/lnf_sa1.pdf) >. Acesso em: 14 de Maio de 2017.
- [62] GRAU - °GL. Ficha de informação do produto, Levedura JP-1. Disponível em: < <http://www.graugl.com.br/products/jp1/> >. Acesso em: 14 de Maio de 2017.
- [63] RENDLEMAN, C. M. & SHAPOURI, H. New Technologies in Ethanol Production. United States Department of Agriculture, 842, p. 33, Agricultural Economic Report **2007**.
- [64] ASPENTECH. Design and Optimize Chemical Processes with Aspen Plus®. Disponível em: < <http://origin-www.aspentech.com/products/engineering/aspen-plus/> >. Acesso em: 02 de Maio de 2017.